

Tiago João Berenguer Alves Figueiredo Pernes
Licenciado em Bioquímica (UNL)



Desenvolvimento de bionanoconjugados com nanopartículas de ouro e oxidases para a detecção de poluentes ambientais

Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Professor Ricardo Franco

Departamento de Química
Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Desenvolvimento de bionanoconjugados com nanopartículas de ouro para a detecção de poluentes ambientais Copyright © 2012

Tiago João Pernes

Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa

Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

A realização desta dissertação marca o fim de uma importante etapa da minha vida. Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma decisiva para a sua concretização.

Começo por agradecer Professor Ricardo Franco (Orientador) pela disponibilidade, colaboração, conhecimentos transmitidos e capacidade de estímulo ao longo de todo o trabalho.

Ao Dr. Peter Eaton pela colaboração e disponibilidade de efectuar a análise por microscopia electrónica de varrimento e espectroscopia fotoelectrónica de raio-X do biossensor nas suas diferentes fases de desenvolvimento.

Ao grupo do laboratório de Bionanotecnologia, Dr. João Cortez, Inês O., João L., Leonor, Pedro, Inês G., Jonnatan, Daniel G, Cláudia e Diana. Muito obrigado pela boa disposição, a disponibilidade e ajuda em todas as etapas necessárias para finalizar este trabalho.

Por último, manifesto um sentido e profundo reconhecimento à minha família pelo apoio e ajuda incondicional ao longo destes anos que me permitiu chegar até aonde cheguei e tornar-me na pessoa em que sou actualmente. Expresso sentimento idêntico em relação a todos os meus amigos de longa data.

A todos que me ajudaram a ser quem sou, que depositam confiança em mim e para os quais sou uma esperança, resta-me apenas dizer um Muito Obrigado...

Índice

Agradecimentos	V
Índice	VII
Índice de Figuras	XI
Índice de Tabelas	XV
Lista de Abreviaturas.....	XVII
Resumo	XIX
Abstract.....	XXI
1 Introdução Teórica	3
1.1 Biossensores.....	3
1.1.1 Descrição geral	3
1.1.2 Aplicações e vantagens dos biossensores.....	4
1.1.3 Biossensores na detecção de pesticidas por electroquímica.....	5
1.2 Pesticidas.....	8
1.2.1 Descrição geral e importância da sua utilização na sociedade actual	8
1.2.2 Utilização de pesticidas: benefícios e consequências.....	9
1.2.3 Ácido 2,4 – diclorofenoxiacético	10
1.2.4 Métodos actuais de detecção de pesticidas.....	11
1.3 Bionanotecnologia	12
1.3.1 Conceitos gerais.....	12
1.3.2 Descrição geral e propriedades da nanoescala	12
1.3.3 Nanopartículas de ouro.....	15
1.3.4 Estabilidade das nanopartículas de ouro.....	16
1.3.5 Agentes de revestimento de nanopartículas de ouro	17
1.4 Tirosinase de <i>Agaricus bisporus</i>	19
1.4.1 Origem e caracterização geral	19
1.4.2 Actividade da Tirosinase	20
1.5 Determinação da concentração de pesticida através da percentagem de inibição da enzima	21
1.6 Eléctrodos de óxido de estanho dopados com fluoreto.....	21
1.7 Técnicas utilizadas no desenvolvimento do biossensor	22
1.7.1 Voltametria Cíclica.....	22
1.7.2 Microscopia electrónica de varrimento	23
1.7.3 Espectroscopia fotoelectrónica de Raio-X	24
2 Procedimentos Experimentais	29

2.1	Síntese de nanopartículas de ouro	29
2.2	Ensaio de estabilidade das nanopartículas – Força iónica e pH	29
2.3	Determinação da concentração de proteína	30
2.4	Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio – SDS-PAGE.....	30
2.5	Electroforese em gel de poliacrilamida nativo – Teste de actividade da Tirosinase	31
2.6	Ensaio de Actividade da Tirosinase	31
2.6.1	Preparação dos bionanoconjugados de Tirosinase	31
2.7	Desenvolvimento do biossensor de Tirosinase	32
2.7.1	Pré-tratamento dos eléctrodos de FTO	33
2.7.2	Electrodeposição da solução de ouro sobre os eléctrodos de FTO	33
2.7.3	Verificação do sucesso da electrodeposição do ouro sobre os eléctrodos através de ensaios de voltametria cíclica utilizando ferricianeto de potássio como analito padrão.....	33
2.7.4	Modificação da superfície dos eléctrodos de ouro depositado com MPA seguido de uma solução de EDC/NHS	34
2.7.5	Ligação da Tirosinase ao eléctrodo	34
2.7.6	Verificação do sucesso da ligação da Tirosinase aos eléctrodos através de ensaios de voltametria cíclica utilizando ferricianeto de potássio como analito padrão e catecol como substrato da Tirosinase.	34
2.7.7	Caracterização dos eléctrodos: AuNP-FTO, MPA-AuNP-FTO e Tirosinase-AuNP-FTO através de microscopia electrónica de varrimento e de espectroscopia fotoelectrónica de raio-x.....	35
2.7.8	Ensaio de voltametria cíclica com o biossensor utilizando o catecol como substrato da Tirosinase e o pesticida 2,4 – D como inibidor da sua actividade.....	35
2.7.9	Determinação da concentração de pesticida através da percentagem de inibição da enzima	35
3	Apresentação e Discussão de Resultados	39
3.1	Determinação da pureza da Tirosinase e das condições óptimas de pH e força iónica para os ensaios dos bionanoconjugados e desenvolvimento do biossensor.	39
3.1.1	Determinação da concentração das nanopartículas de ouro sintetizadas	39
3.1.2	Ensaio de agregação de nanopartículas de ouro com o aumento da força iónica	40
3.1.3	Ensaio de agregação de nanopartículas de ouro com a variação do pH	44
3.1.4	Determinação da quantidade de proteína presente no <i>stock</i> de Tirosinase pelo método do ácido bicinconínico	48
3.1.5	Verificação da pureza por SDS-PAGE e actividade por PAGE do <i>stock</i> de Tirosinase	48
3.2	Determinação da actividade da Tirosinase livre e de bionanoconjugados de Tirosinase, com diferentes agentes de revestimento, na gama de pH 4-8.....	50
3.3	Desenvolvimento do biossensor.....	53
3.3.1	Electrodeposição do ouro sobre o eléctrodo de FTO	53
3.3.2	Verificação do sucesso da electrodeposição do ouro através de ensaios de voltametria cíclica com o ferricianeto de potássio	54
3.3.3	Verificação do sucesso da ligação da Tirosinase ao eléctrodo através de ensaios de voltametria cíclica com o ferricianeto de potássio.....	57

3.3.4	Caracterização de diferentes fases do desenvolvimento do biossensor por Espectroscopia Electrónica de Varrimento e Espectroscopia Fotoelectrónica de raio-X.....	60
3.3.5	Ensaio de voltametria cíclica utilizando o catecol como substrato da Tirosinase. Detecção da inibição da Tirosinase pelo catecol.....	65
3.3.6	Determinação da concentração de catecol que não provoque inibição na Tirosinase.....	69
3.3.7	Determinação da sensibilidade do biossensor de Tirosinase ao pesticida 2,4-D por ensaios de voltametria cíclica utilizando catecol como substrato	72
3.3.8	Determinação da concentração de pesticida através da percentagem de inibição da enzima	80
4	Conclusões	83
5	Bibliografia	89
6	Apêndice I.....	95
6.1	Protocolo para a determinação da actividade específica da Tirosinase	95
7	Apêndice II	99
7.1	Ensaio de SEM da superfície dos eléctrodos AuNP-FTO, MPA-AuNP-FTO e Tirosinase-AuNP-FTO	99
7.1.1	Resultados de SEM da superfície do eléctrodo AuNP-FTO	99
7.1.2	Resultados de SEM da superfície do eléctrodo MPA-AuNP-FTO	100
7.1.3	Resultados de SEM da superfície do eléctrodo Tirosinase-AuNP-FTO	101
8	Apêndice III.....	105
8.1	Resultados de XPS da superfície do eléctrodo AuNP-FTO.....	105
8.2	Resultados de XPS da superfície do eléctrodo Tirosinase-AuNP-FTO.....	107

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Representação esquemática de um biossensor, adaptado de Mosafa, <i>et al.</i> ¹	3
Figura 1.2 – Diferentes tipos de ligação entre o analito e o biorreceptor, adaptado de Guibault, <i>et al.</i> ²	3
Figura 1.3 – Esquema resumo das técnicas que se podem utilizar para efectuar a ligação entre o sensor e o biorreceptor, adaptado de Guibault, <i>et al.</i> ²	4
Figura 1.4 – Esquema de montagem do biossensor desenvolvido por Kim, <i>et al.</i> ⁶ GC- Eléctrodo de carbono vítreo; AuNP – Nanopartículas de ouro; SAM – Monocamada automontada; Tyr – Tirosinase.....	7
Figura 1.5 – Esquema resumo dos possíveis efeitos da exposição aos pesticidas por parte do Homem.	10
Figura 1.6 – Estrutura química do pesticida 2,4-D.....	11
Figura 1.7 – Imagens de equipamentos de técnicas utilizadas na detecção de pesticidas. Da esquerda para a direita apresenta-se equipamento de HPLC, cromatografia capilar gasosa e espectrofotómetro UV/VIS. ³⁵	11
Figura 1.8 – a) Esquema ilustrativo de uma micropartícula com 60 µm, de largura semelhante a um cabelo humano, e o número de nanopartículas de 600 nm e 60 nm de diâmetro, com a mesma massa que a micropartícula. b) Relação entra a normalização da área com a massa em função do diâmetro das partículas. c) Temperatura de fusão do ouro em função do diâmetro das partículas; a temperatura de fusão de partículas de ouro no material (“bulk melting temperature”) é de 1336 K. ³⁹	13
Figura 1.9 – Esquema representativo da interação da radiação electromagnética com uma nanopartícula metálica. ³⁷	14
Figura 1.10 – Soluções de nanopartículas de ouro de diferentes tamanhos com as suas cores características. ⁴⁴	15
Figura 1.11 – Espectro de UV/Visível de uma solução de nanopartículas de ouro de cerca de 20 nm de diâmetro, dispersas (espectro a vermelho) e agregadas (espectro a azul).	17
Figura 1.12 – Moléculas utilizadas no revestimento de nanopartículas de ouro para ensaios com biomoléculas. O 11-mercaptopundecanóico (MUA), o 3-mercaptopropanóico (MPA) e o péptido CALNN.....	18
Figura 1.13 – Imagem do cogumelo da espécie <i>Agaricus bisporus</i> de onde é extraída a Tirosinase....	19
Figura 1.14 – Estrutura tridimensional obtida por difracção de raios-X da Tirosinase de <i>Agaricus bisporus</i> . Estão identificadas as quatro subunidade características desta enzima, duas subunidades H e duas subunidades L. As subunidades H ligam-se as L, ligação H-L, sendo que a H1 liga com a L1 e a H2 liga com a L2. ⁵¹	19

Figura 1.15 –Tirosinase – via da Cresolase. a) passo inicial onde ocorre a oxidação de um monofenol para difenol; b) oxidação do difenol, formado no passo a), para a orto-quinona respectiva. ⁵⁹	20
Figura 1.16 –Tirosinase – via da Catecolase. A Tirosinase oxida directamente duas moléculas de um difenol e dá origem a duas moléculas da orto-quinona correspondente. ⁵⁹	20
Figura 1.17 – Imagem típica de SEM de um eléctrodo com nanopartículas de ouro electrodepositadas. ^{46a}	24
Figura 1.18 – Esquema representativo da técnica de XPS, demonstrando a zona excitada pelo feixe de Raio-X e os acontecimentos posteriores a esse excitação.....	25
Figura 2.1 – Esquema do desenvolvimento do biossensor, demonstrando as várias etapas que são necessárias para a sua construção.	32
Figura 3.1 – Espectro UV/Vis de 200 – 800 nm de nanopartículas de ouro sintetizadas com uma diluição 1:4 em água milli-Q.	39
Figura 3.2 – Espectros de UV/visível de AuNP (3 nM), com diferentes agentes de revestimento, com o aumento da concentrações de NaCl. A – AuNP; B – AuNP-MUA; C AuNP-CALNN.....	41
Figura 3.3 – Gráficos das razões de agregação das AuNP com o aumento da concentração de NaCl, para vários agentes de revestimento. A- AuNP; B – AuNP-MUA; C – AuNP-CALNN.....	43
Figura 3.4 – Espectros de UV/visível de AuNP (3 nM), com diferentes agentes de revestimento, com a variação de pH. A – AuNP; B – AuNP-MUA; C AuNP-CALNN	45
Figura 3.5 – Gráficos das razões de agregação das AuNP com a variação de pH, para vários agentes de revestimento. A- AuNP; B – AuNP-MUA; C – AuNP-CALNN	47
Figura 3.6 – Recta de calibração do método de BCA efectuada com concentrações conhecidas de BSA: 0, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 µg/mL.....	48
Figura 3.7 – Gel de SDS-PAGE de uma amostra do <i>stock</i> de Tirosinase. Poço 1 – Padrões Moleculares; Poço 3 – Amostra do <i>stock</i> de Tirosinase.	49
Figura 3.8 – Comparação das duas metades do gel de PAGE, uma colocada em solução de L-Tirosina 1 mM (gel da esquerda) e outra colocada a corar em azul Coomassie (gel da direita).	50
Figura 3.9 – Actividade da Tirosinase livre e de bionanoconjugados de Tirosinase com os três tipos de agentes revestimento diferentes. A actividade é expressa em Unidade/mL de enzima (U/mL). ..	51
Figura 3.10 – Actividade dos bionanoconjugados de Tirosinase face à actividade da Tirosinase livre, em valor percentual.....	52
Figura 3.11 – Electrodeposição do ouro por voltametria cíclica a uma velocidade de varrimento de 0,010 V/s durante 5 ciclos de deposição.....	53
Figura 3.12 – Ensaio de voltametria cíclica do ferricianeto de potássio a 1 mM, a várias velocidades de varrimento, no eléctrodo de FTO.....	55
Figura 3.13 - Ensaio de voltametria cíclica com ferricianeto de potássio a 1 mM, a várias velocidades de varrimento, no eléctrodo de AuNP-FTO.	55

Figura 3.14 – Gráficos das correntes catódica (I_{pc}) e anódica (I_{pa}) vs a velocidade de varrimento ($(mV/s)^{1/2}$). A) Gráfico respeitante ao eléctrodo de FTO; B) Gráfico respeitante ao eléctrodo de AuNP-FTO.	57
Figura 3.15 - Ensaio de voltametria cíclica com ferricianeto de potássio a 1 mM, a várias velocidades de varrimento, no eléctrodo de Tirosinase-AuNP-FTO.	58
Figura 3.16 - Gráficos das correntes catódica (I_{pc}) e anódica (I_{pa}) vs a velocidade de varrimento ($(mV/s)^{1/2}$) para o eléctrodo Tirosinase-AuNP-FTO.	59
Figura 3.17 – Ensaio de SEM para dois eléctrodos em diferentes estados de desenvolvimento do biossensor. Da esquerda para a direita, o eléctrodo AuNP-FTO e o eléctrodo Tirosinase-AuNP-FTO.	60
Figura 3.18 – Análise por SEM-EDS dos elementos constituintes dos três eléctrodos analisados. A – AuNP-FTO; B – MPA-AuNP-FTO e C – Tirosinase-AuNP-FTO.	62
Figura 3.19 - Ensaio de voltametria cíclica com catecol a 1mM, a uma velocidades de varrimento de 0,1 V/s, no eléctrodo de AuNP-FTO. Atm: Ensaio efectuado em atmosfera normal; Nitro: Ensaio efectuado atmosfera saturada em azoto; O2: Ensaio efectuado em atmosfera saturada em oxigénio. Os tempos indicados correspondem ao período de borbulhamento de oxigénio na solução.	66
Figura 3.20 - Ensaio de voltametria cíclica com catecol a 1mM, a uma velocidades de varrimento de 0,1 V/s, no eléctrodo de Tirosinase-AuNP-FTO. Atm: Ensaio efectuado em atmosfera normal; Nitro: Ensaio efectuado atmosfera saturada em azoto; O2: Ensaio efectuado em atmosfera saturada em oxigénio. Os tempos indicados correspondem ao período de borbulhamento de oxigénio na solução.	67
Figura 3.19 – Esquema da inibição suicida da Tirosinase na presença de excesso de substrato difenol. ^{75a}	69
Figura 3.20 - Ensaio de voltametria cíclica com catecol a 150 μ M, a uma velocidades de varrimento de 0,1 V/s, no eléctrodo de Tirosinase-AuNP-FTO sem se observar inibição da Tirosinase. Voltamograma preto: Efectuado com a atmosfera saturada em oxigénio; Voltamograma vermelho: Efectuado seguir ao voltamograma preto e permanência do eléctrodo em solução por mais 5 minutos com borbulhamento de oxigénio; Voltamograma azul: Efectuado seguir ao voltamograma vermelho e permanência do eléctrodo em solução por mais 10 minutos com borbulhamento de oxigénio.	70
Figura 3.21 - Ensaio de voltametria cíclica com catecol a 200 μ M, a uma velocidades de varrimento de 0,1 V/s, no eléctrodo de Tirosinase-AuNP-FTO observar-se inibição clara da Tirosinase. Voltamograma preto: Efectuado com a atmosfera saturada em oxigénio; Voltamograma vermelho: Efectuado seguir ao voltamograma preto e permanência do eléctrodo em solução por mais 5 minutos com borbulhamento de oxigénio; Voltamograma azul: Efectuado seguir ao	

voltamograma vermelho e permanência do eléctrodo em solução por mais 10 minutos com borbulhamento de oxigénio.	71
Figura 3.22 – Ensaios de voltametria cíclica utilizando o catecol a 150 μ M como substrato da Tirosinase e aumento da concentração de pesticida 2,4-D antes de cada voltamograma. Velocidade de varrimento = 0,025 V/s. Voltamograma preto: efectuado após a saturação da solução com oxigénio durante 10 minutos; Voltamograma vermelho: efectuado após a saturação da solução com oxigénio durante 20 minutos.....	73
Figura 3.23 – Gráfico das correntes anódica, catódica e o rácio entre ambas em função da concentração do pesticida 2,4-D. Recta preta traçada no gráfico representa o rácio de $I_{pa}/I_{pc} = 1$	74
Figura 3.24 – Gráfico da corrente catódica em função da concentração do pesticida 2,4-D.	75
Figura 3.25 - Ensaios de voltametria cíclica utilizando o catecol a 150 μ M como substrato da Tirosinase e aumento da concentração de pesticida 2,4-D antes de cada voltamograma. Velocidade de varrimento = 0,025 V/s. A) – Concentração de 2,4-D: 0,018-0,998 ng/mL; B) – Concentração de 2,4-D: 0,998-21,5 ng/mL.	77
Figura 3.26 – Gráfico das correntes anódica, catódica e o rácio entre ambas em função da concentração do pesticida 2,4-D de 0,018 a 1 ng/mL. Recta preta traçada no gráfico representa o rácio de $I_{pa}/I_{pc} = 1$	78
Figura 3.27 – Gráfico da corrente catódica em função da concentração do pesticida 2,4-D. Ponto a vermelho foi excluído de forma a melhorar a qualidade da recta.....	79
Figura 3.28 – Gráfico da percentagem de inibição da Tirosinase em função da concentração do pesticida 2,4-D. Ponto a vermelho foi excluído de forma a melhorar a qualidade da recta de calibração.	80
Figura 7.1 – Resultados, obtidos por SEM, da superfície do eléctrodo AuNP-FTO com diferentes ampliações.	99
Figura 7.2 – Resultados, obtidos por SEM, da superfície do eléctrodo MPA-AuNP-FTO com diferentes ampliações.....	100
Figura 7.3 – Resultados, obtidos por SEM, da superfície do eléctrodo Tirosinase-AuNP-FTO com diferentes ampliações.....	101

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Resumo das vantagens da utilização dos biossensores face às técnicas tradicionais. ¹	5
Tabela 3.1 – Tabela com os valores calculados, da diferença entre o potencial catódico e o anódico, para os eléctrodos FTO e AuNP-FTO.	56
Tabela 3.2 – Tabela com os valores calculados, da diferença entre o potencial catódico e o anódico, para o eléctrodo Tirosinase-AuNP-FTO.....	59
Tabela 3.3 – Tabela de resultados do XPS para o eléctrodo AuNP-FTO. Anodo – Al monocromático; E° - 15 kV (90 W); Modo da lente – Híbrido; Iris – Ranhura; Neutralizador de carga – Ligado; Correção de carga – 2,6 eV (Ref: C1s 285 eV).	63
Tabela 3.4 – Tabela de resultados do XPS para o eléctrodo Tirosinase-AuNP-FTO. Anodo – Al monocromático; E° - 15 kV (90 W); Modo da lente – Híbrido; Iris – Ranhura; Neutralizador de carga – Ligado; Correção de carga – 2,6 eV (Ref: C1s 285 eV). * medição efectuada utilizando o espectro de suavização.....	64

Lista de Abreviaturas

AuNP – Nanopartículas de Ouro funcionalizadas com citrato

AuNP-MUA – Nanopartículas de Ouro funcionalizadas com Ácido 11-Mercapto-Undecanóico

AuNP-CALNN – Nanopartículas de Ouro funcionalizadas com o pentapéptido CALNN

2,4-D - Ácido 2,4 – Diclorofenoxiacético

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Resolução

EDC – 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

FTO – Fluoride Tin Oxide (Óxido de estanho dopado com fluoreto)

MPA – Ácido 3-Mercaptopropanóico

MUA – Ácido 11-Mercaptoundecanóico

NHS – N-Hidroxisuccinamida

L-DOPA – L-3,4-dihidroxifenilalanina

AuNP-FTO – Eléctrodo de FTO com nanopartículas de ouro depositado à sua superfície

MPA-AuNP-FTO – Eléctrodo de FTO com MPA ligado às nanopartículas de ouro

Tirosinase-AuNP-FTO – Eléctrodo de FTO com a Tirosinase ligada às nanopartículas de ouro

SDS-PAGE – Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecilssulfato de sódio

PAGE – Electroforese em gel de poliacrilamida nativo

SEM – Microscopia electrónica de varrimento

XPS – Espectroscopia fotoelectrónica de Raio-X

BSA – Albumina do soro de bovino

BCA – Ácido bicinconínico

Resumo

O presente estudo teve como principal objectivo o desenvolvimento de um biossensor baseado em Tirosinase, com a conjugação de nanopartículas de ouro, para a detecção de pesticidas. O objectivo secundário foi verificar se os bionanoconjugados de Tirosinase e nanopartículas de ouro com diferentes agentes de revestimento, aumentavam a eficiência catalítica da Tirosinase, comparativamente com a enzima livre.

Os ensaios em solução da actividade da Tirosinase livre e em bionanoconjugados, com diferentes agentes de revestimento – Citrato, ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) e o pentapéptido CALNN, numa gama de pH dos 4-8, permitiram concluir que a pH 4 e 5 a Tirosinase livre possui uma maior eficiência catalítica do que qualquer dos bionanoconjugados. Já a pH 6, 7 e 8 o bionanoconjugado revestido com CALNN é o que possui maior eficiência catalítica quando comparado com os restantes bionanoconjugados e Tirosinase livre, aumentando a actividade da Tirosinase em 26% a pH 6, em 6% a pH 7 e em 11% a pH 8.

O biossensor de Tirosinase desenvolvido efectua a reacção de oxidação de compostos fenólicos a quinonas. A detecção de pesticidas é efectuada através da inibição da actividade de Tirosinase. O biossensor de Tirosinase foi desenvolvido sobre um eléctrodo de óxido de estanho dopado com fluoreto (FTO), à sua superfície foram sintetizadas nanopartículas de ouro por electrodeposição, com adição posterior de uma camada auto-montada de ácido 3-Mercaptopropanóico, que permitiu a ligação covalente da Tirosinase ao eléctrodo por *cross-linking* com a ajuda dos compostos 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida/ N-Hidroxisuccinamida. O biossensor foi caracterizado por microscopia electrónica de varrimento (SEM) e espectroscopia fotoelectrónica de Raio-X (XPS). Foi possível concluir que a electrodeposição do ouro ocorre com a formação de nanopartículas sobre o eléctrodo de forma uniforme sobre toda a sua área e a ligação da Tirosinase ao eléctrodo ocorre especificamente nas zonas do eléctrodo com nanopartículas de ouro e ácido 3-mercaptopropanóico sobre as mesmas.

O composto fenólico seleccionado como substrato da Tirosinase foi o catecol. Para concentrações deste substrato superiores a 150 μM , determinou-se a ocorrência de inibição suicida da enzima, nas condições experimentais ensaiadas. A monitorização da reacção de oxidação de catecol com o biossensor desenvolvido foi efectuada com sucesso.

Os resultados de voltametria cíclica com adição de pesticida (ácido 2,4 – diclorofenoxyacético (2,4-D)) permitiram concluir que a gama de concentrações detectável pelo biossensor desenvolvido é de 0,018-0,7 ng/mL, com uma inibição gradual do biossensor entre os 15 e 65 % de analito. O biossensor apresentou ainda um limite de detecção (LOD) de $0,0329 \pm 0,0144$ ng/mL e uma concentração de saturação de aproximadamente 1 ng/mL para o analito em estudo.

Palavras chave: Biossensor; Nanopartículas de ouro (AuNP); Pesticida; Tirosinase

Abstract

The main objective of the present Thesis study was the development of a Tyrosinase biosensor, with the conjugation of gold nanoparticles, for the detection of pesticides. A secondary objective was to assess the catalytic efficiency of Tyrosinase-gold nanoparticle bionanoconjugates, with different capping agents, when compared to free Tyrosinase.

Activity assays of free Tyrosinase and Tyrosinase bionanoconjugates, with different capping agents – Citrate, 11-mercaptoundecanoic acid and the pentapeptide CALNN, in the pH range between 4-8, showed that at pH 4 and 5, free Tyrosinase has a higher catalytic efficiency than any of the Tyrosinase bionanoconjugates. In contrast, at pH 6-8 Tyrosinase bionanoconjugates with CALNN as capping agent, showed larger catalytic efficiency when compared to bionanoconjugates with other capping agents and free Tyrosinase. Tyrosinase activity increased 26% at pH 6, 6% at pH 7 and 11% at pH 8.

The developed Tyrosinase biosensor performs the oxidation reaction of phenolic compounds to quinones. The detection of pesticides is through the inhibition of Tyrosinase activity. The Tyrosinase biosensor was developed on a tin oxide electrode doped with fluoride electrode (FTO). Gold nanoparticles were synthesized at the electrode surface by electrodeposition. These electrodeposited gold nanoparticles were coated with 3-mercaptopropionic acid and Tyrosinase was cross-linked to the electrode using 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide / N-hydroxysuccinimide.

The biosensor was characterized by scanning electron microscope and X-ray photoelectron spectroscopy. These techniques allowed to conclude that gold electrodeposition with the formation of gold nanoparticles on the electrode is uniform in all the electrode area and leads to the formation of small gold nanoparticles clusters spread in all the electrode. Tyrosinase binding to the electrode was also shown to be specific to the electrode areas which have gold nanoparticles with 3-mercaptopropionic acid as capping agent.

The phenolic compound selected as Tyrosinase substrate was catechol. The monitoring of the oxidation reaction of this compound, with the developed biosensor, was successful. The monitoring was carried out by cyclic voltammetry assays, detecting the oxidation of catechol around -0.3 V and the appearance of the quinone around -0.1 V. Catechol concentrations above 150 mM turn this substrate into a suicide inhibitor of Tyrosinase.

Results of cyclic voltammetry with addition of pesticides allowed to conclude that the pesticide concentration detection range by the biosensor is between 0,018–0,7 ng/mL. In the same concentration range, Tyrosinase inhibition was observed between 15 and 65%. The limit of detection (LOD) is $0,0329 \pm 0,0144$ ng/mL and the biosensor saturation concentration is approximately 1 ng/mL.

Keywords: Biosensor; Gold nanoparticles (AuNP); Pesticides; Tyrosinase

Capítulo I: Introdução Teórica

1 Introdução Teórica

1.1 Biossensores

1.1.1 Descrição geral

Um biossensor pode ser definido como um dispositivo analítico que conjuga a utilização de compostos biológicos com métodos de detecção bioquímicos de forma a detectar o analito em estudo (Fig.1.1).

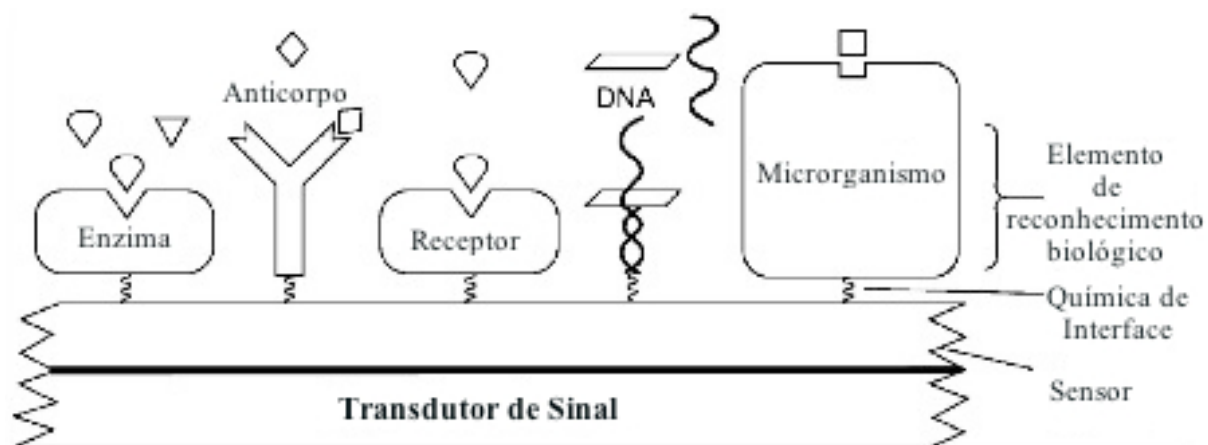


Figura 1.1 – Representação esquemática de um biossensor, adaptado de Mosafa, *et al.*¹

O biossensor é composto por duas partes de extrema importância, o biorreceptor e o transdutor. O biorreceptor biológico, que pode ser desde uma enzima até a um segmento de DNA, é utilizado para reconhecer e criar uma ligação entre o biossensor e o analito. Existem diferentes tipos de ligação entre o biorreceptor e o analito (Fig.1.2), esta ligação varia consoante o tipo de analito a detectar ou o tipo de sinal que se quer obter.²



Figura 1.2 – Diferentes tipos de ligação entre o analito e o biorreceptor, adaptado de Guibault, *et al.*²

O transdutor é um dispositivo que transforma uma forma de sinal noutra, este sinal pode ser eléctrico, mecânico, electromagnético, químico ou ainda térmico. Qualquer dispositivo que converta energia nos seus diferentes tipos pode ser utilizado como transdutor, contudo é sempre necessário ter um detector/sensor de forma a receber o sinal do transdutor. No que diz respeito aos biossensores, existe a transformação do sinal resultante da interação do biorreceptor com o analito em outro de mais fácil medição e quantificação.

Uma passo importante no desenvolvimento de um biossensor é a escolha do melhor tipo de ligação entre o biorreceptor e a superfície do sensor.¹ Existem diversas técnicas de imobilização que podem ser utilizadas (Fig.1.3), contudo é importante fazer a escolha correcta já que esta ligação vai influenciar na possibilidade de reutilização do biossensor, na estabilização da cinética de ligação entre o analito e o composto biológico, na minimização de problemas difusionais e na garantia de que o local de ligação, entre biorreceptor e analito, não é utilizado para a ligação entre o sensor e o biorreceptor.

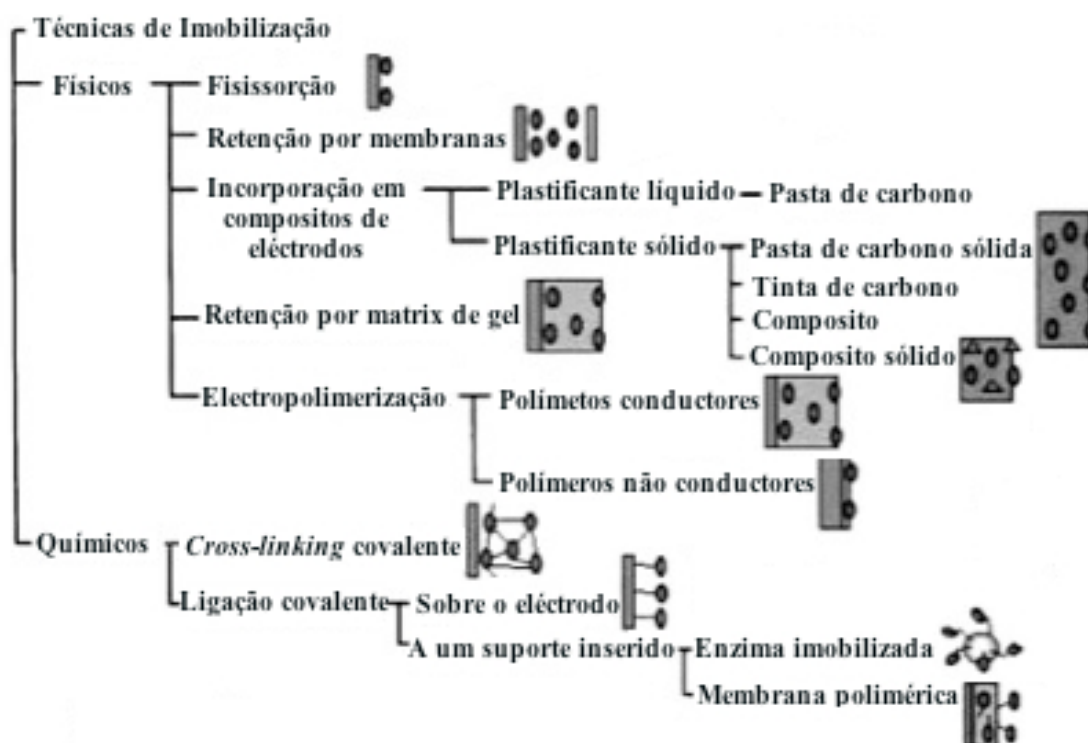


Figura 1.3 – Esquema resumo das técnicas que se podem utilizar para efectuar a ligação entre o sensor e o biorreceptor, adaptado de Guibault, *et al.*²

1.1.2 Aplicações e vantagens dos biossensores

Actualmente a grande diversidade de biossensores permite que estes sejam utilizados em diversas áreas, para a detecção de diversos tipos de analitos, em diferentes áreas nomeadamente:¹⁻²

- **Medicina:** Utilizados em diagnóstico e tratamento de doenças; detecção de drogas, álcool e esteroides; monitorização de anestéticos e anticoagulantes em pacientes hospitalizados.
- **Ambiente:** Detecção de pesticidas, metais pesados, entre outros compostos prejudiciais ao ambiente e à saúde pública em água, solos, alimentos e até na atmosfera. São ainda utilizados para determinar níveis de substâncias tóxicas durante processos de biorremediação.
- **Saúde pública:** Detecção de substâncias características da presença de microrganismos em alimentos ou locais públicos de forma a que se possam substituir os ensaios microbiológicos que são muito demorados em comparação com os resultados obtidos com um biossensor. Determinação de drogas proibidas utilizadas para promover o crescimento de espécies vegetais e animais para consumo e venda ao público.

O aumento da necessidade de efectuar ensaios de detecção de compostos perigosos, como pesticidas, em países ou zonas desfavorecidas que não possuam recursos monetários para a aquisição e técnicos competentes para a utilização dos equipamentos necessários, para realizar os métodos analíticos já referidos acima, fez com que fosse necessário desenvolver novos métodos de detecção que permitissem ser utilizados em qualquer local e por qualquer pessoa. Desta forma, começaram-se a desenvolver os biossensores, equipamentos de detecção com múltiplas funções e que possuem diversas vantagens comparativamente às técnicas tradicionais (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 – Resumo das vantagens da utilização dos biossensores face às técnicas tradicionais.¹

Factor	Técnicas Tradicionais	Biossensor
Custos	Elevado	Médio
Consumo de Tempo	Elevado	Baixo
Ensaio <i>In Situ</i>	Nenhum	Maioria
Pré-tratamento da amostra	Extenso e complicado	Simple
Sensibilidade	Muito elevada	Elevada

1.1.3 Biossensores na detecção de pesticidas por electroquímica

Os biossensores utilizam diversas moléculas biológicas como agente de bioreconhecimento, contudo quando se utilizam métodos electroquímicos os agentes de bioreconhecimento normalmente utilizados são as enzimas, apesar de se poderem utilizar outras moléculas biológicas como os ácidos nucleicos, anticorpos ou ainda microrganismos. Tal facto deve-se à sua elevada especificidade em relação ao substrato e à sua actividade catalítica, que permite executar os ensaios em condições muito semelhantes às fisiológicas.³

A utilização de ensaios de electroquímica na detecção de pesticidas é apenas possível se a reacção em estudo gerar uma corrente, um potencial, uma acumulação de carga ou altere a condutividade da solução entre os eléctrodos que seja mensurável. Os ensaios podem ser efectuados com diferentes técnicas electroquímicas, com vista a medição de diferentes tipos de metabolitos por diversas abordagens. A corrente gerada é detectada por ensaios de Amperometria, o potencial e a acumulação de carga são detectados por ensaios de Conductometria e a impedância é detectada por ensaios impedimétricos.³

Os ensaios de amperometria podem ser utilizados em biossensores uma vez que possibilitam a medição continua de corrente resultante da oxidação ou redução de uma espécie electroactiva numa reacção bioquímica.³ Um dos biossensores amperimétricos mais simples, que demonstra facilmente os princípios dos ensaios amperimétricos, é o eléctrodo de oxigénio de Clark, que mede a corrente da redução do oxigénio que é proporcional a sua concentração em solução.⁴ Os ensaios em que a corrente é medida a um valor de potencial constante denominam-se de amperometria, já os ensaios em que a corrente é medida com uma variação do potencial, num intervalo controlado, é denominam-se de voltametria.³ No que diz respeito à voltametria, o valor do pico de corrente medido num intervalo linear de potencial é proporcional à concentração do analito, espécie electroactiva, no *bulk* da solução.⁴⁻⁵ Contudo, nem todas as proteínas são capazes de realizar reacções redox, desta forma é necessário utilizar-se mediadores. Os mediadores são compostos reagem como aceitadores e dadores de electrões ou reagem com os produtos da reacção da proteína. Através desta reacção paralela é possível detectar, a presença ou ausência do analito em estudo e quantifica-lo, uma vez que os resultados obtidos na reacção secundaria estão, normalmente, relacionados linearmente com a reacção principal.³ Existem diversos trabalhos publicados que demonstram o sucesso e a utilidade da utilização de ensaios de amperometria em biossensores de pesticidas, nomeadamente o utilizando amperometria e voltametria cíclica como o trabalho publicado por Kim, *et al.*⁶. Neste trabalho Kim, *et al.*⁶ desenvolveu um biossensor, capaz de detectar vários pesticidas em concentrações de ppt, utilizando como base um eléctrodo de carbono vítreo aonde, por electrodeposição, sintetizou uma camada de nanopartículas de ouro. A camada de nanopartículas de ouro foi modificada com MPA e EDC/NHS para formar uma monocamada automontada e ligar a esta a Tirosinase por cross-linking (Fig. 1.4). O trabalho desenvolvido por Liu, *et al.*⁷ que desenvolveu um biossensor para a detecção de pesticidas organofosforados através de ensaios de cronoamperometria, é também um bom exemplo da utilização da amperometria no desenvolvimento de biossensores para a detecção de pesticidas.

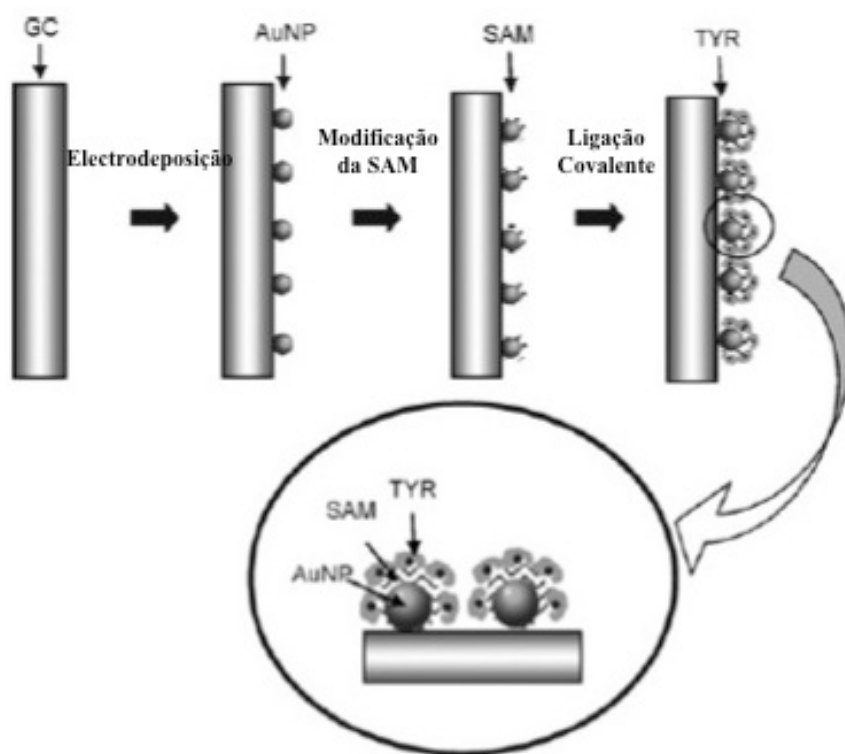


Figura 1.4 – Esquema de montagem do biossensor desenvolvido por Kim, *et al.*⁶ GC- Eléctrodo de carbono vítreo; AuNP – Nanopartículas de ouro; SAM – Monocamada automontada; Tyr – Tiosinase.

Os ensaios de potenciometria são utilizados para medir a acumulação de um potencial de carga no eléctrodo de trabalho em comparação com o eléctrodo de referência, num célula electroquímica aonde a corrente é igual a zero, ou seja, os ensaios de potenciometria fornecem informação acerca da concentração e o respectivo potencial de carga dos iões numa reacção electroquímica face a um eléctrodo de referência.³ Em ensaios experimentais a relação entre a concentração dos iões e o seu potencial de carga é feita através da equação de Nernst (Equação 1), aonde $E^{\circ}_{célula}$ representa o potencial que a célula possui quando a corrente é igual a zero, o R é a constante universal dos gases, T é a temperatura do ensaio (em graus Kelvin), o n é o número de electrões envolvido na reacção redox, o F é a constante de Faraday e o Q é o rácio entre a concentração iónica no ânodo e a concentração iónica do cátodo.

$$E_{célula} = E^{\circ}_{célula} - \frac{RT}{nF} \ln Q \quad (1)$$

Os ensaios potenciométricos provaram ser adequados para efectuar medições, em pequenos volumes, contudo são limitados os analitos que podem ser detectados a baixas concentrações por esta técnica, nomeadamente analitos como mercúrio ou o arsénio que são compostos a ter em conta quando se efectuam análises de contaminação por poluentes.⁸ Apesar desta limitação existe diversos trabalhos publicados, aonde foram desenvolvidos, com sucesso, biossensores conductimétricos na detecção de

pesticidas organofosforados por Zhang, *et al.*⁹ ou a detecção de pesticidas através quantificação de surfactantes utilizados na modificação de pesticidas por Umino, *et al.*¹⁰

Os ensaios de conductometria possibilitam medir a capacidade que um analito ou um meio tem de conduzir correntes eléctrica entre dos eléctrodos. Desta forma utiliza-se a conductometria em ensaios enzimáticos para detectar variações na condutividade da solução, variações na força iónica, entre dois eléctrodos à medida que a reacção enzimática ocorre. Contudo em amostras que possuam uma elevada força iónica, a detecção de pequenas variações na mesma torna-se bastante difícil. Existe assim uma limitação deste tipo de ensaios, principalmente em alguns tipos de biossensores enzimáticos em que a amostra a analisar possui elevada força iónica ou a enzima só é activa a forças iónicas mais elevadas.⁵ Apesar de esta desvantagens, existe um crescente interesse na combinação de biossensores conductimétricos com nanoestruturas, especialmente nanotubos, para o desenvolvimento de novos biossensores¹¹ e existe também o desenvolvimento de biossensores para detecção de pesticidas utilizando ensaios conductimétricos, como foi efectuado por Anh, *et al.*¹² que desenvolveu um biossensor para a detecção de compostos tóxicos, incluindo pesticidas, em amostra de água reais.

1.2 Pesticidas

1.2.1 Descrição geral e importância da sua utilização na sociedade actual

Pesticida pode ser definido como sendo uma substância ou uma mistura de substâncias que é utilizada para prevenir, destruir ou apenas inibir e repelir pragas.¹³ Os pesticidas podem-se dividir em várias subclasses: os insecticidas, herbicidas, fungicidas, rodenticidas, pediculicidas, biocidas e bactericidas¹⁴, podendo ser classificados por organismo alvo, estrutura química ou ainda pelo seu estado físico.¹⁵

A utilização principal dada aos pesticidas é a de controlar organismos que são potencialmente perigosos para os seres humanos ou para as actividades que estes levam a cabo. Os pesticidas são utilizados para eliminação de mosquitos que propagam doenças como a malária ou febre amarela ou para proteger animais de doenças causadas por parasitas.¹⁶ Herbicidas aplicados na limpeza de plantas indesejadas em locais agrícolas ou lagos, eliminação de insectos e bolores que causam danos em edifícios.¹⁶⁻¹⁷ Pesticidas utilizados na eliminação de roedores e insectos em armazéns de supermercados ou na conservação de alimentos impedindo o aparecimento de bolores e outros microrganismos.¹⁶

1.2.2 Utilização de pesticidas: benefícios e consequências

Actualmente a utilização de pesticidas atinge valores tão elevados, previsão das receitas da venda de pesticidas até 2019 ascenderá aos 58 biliões de dólares¹⁸, que se torna cada vez mais importante estudar os efeitos secundários, positivos e negativos, desta utilização não só no que diz respeito ao Homem, mas também a todo o ambiente.

Os benefícios que advém da utilização de pesticidas afectam de diversas formas o estilo de vida do Homem e o impacto que este tem no planeta como um todo. A utilização de pesticidas possibilita o controlo de pragas e doenças, tanto a nível de gado e culturas, como a nível de saúde pública. Permite obter maiores rendimentos e qualidade na produção de gado e de colheitas. Protecção de zonas selvagens e da biodiversidade, uma vez que a utilização de pesticidas permite a utilização das mesmas zonas para cultura não havendo a necessidade de se utilizarem novos locais para a produção de novas colheitas e de gado. Possibilita ainda a protecção de edifícios e zonas verdes urbanas de serem danificadas por pragas ou microrganismos.¹⁹

As consequências da utilização de pesticidas são bastante elevadas e dependentes de factores, como a utilização dos mesmos por parte do Homem, as propriedades físico-químicas dos pesticidas, em especial, a pressão vapor, a solubilidade em água e o tempo de vida, factores que permitem que haja uma maior ou menor facilidade por parte do pesticida em se difundir no ambiente e se alastrar pelo mesmo.²⁰ As consequências podem ser ambientais, de saúde pública e económicas e estas podem se influenciar mutuamente. As consequência ambientais podem ser atmosféricas, em sistemas aquáticos e no solos, contaminando seres vivos e locais indesejados,²¹ levando à destruição da camada de ozono,²² diminuição da qualidade e produtividade dos solos,²³. No que diz respeito aos seres vivos, estes podem ser afectados pelos pesticidas de diferentes formas, como a inibição da fixação do azoto (em plantas) o que leva à inibição do seu crescimento e desenvolvimento,²⁴ o envenenamento de espécies animais que pode resultar em grande número de perdas ou na existência de fenómenos de bioacumulação e de bioampliação.²⁵ Os efeitos para a saúde pública podem ser a curto ou a longo prazo, consoante estes são agudos ou crónicos (Fig.1.5).²⁶ Os efeitos agudos surgem, normalmente, em trabalhadores que manuseiam directamente os pesticidas, estes podem sentir dores abdominais, tonturas, dores de cabeça, náuseas, vómitos e ainda problemas de pele e olhos.²⁷ Já os efeitos a longo prazo podem originar diversos distúrbios como cancro em diversas zonas do organismo (linfoma, leucemia, rim, etc.)¹⁴, problemas neurológicos, como aumento da probabilidade de desenvolver doença de Parkinson²⁸, fortes evidências ligam a exposição a pesticidas ao nascimento de crianças com deficiências, à alteração do crescimento de fetos ou até mesmo a morte dos mesmos.²⁹ Foram ainda associados à exposição de pesticidas, nomeadamente o 2,4-D, casos de infertilidade masculina.³⁰

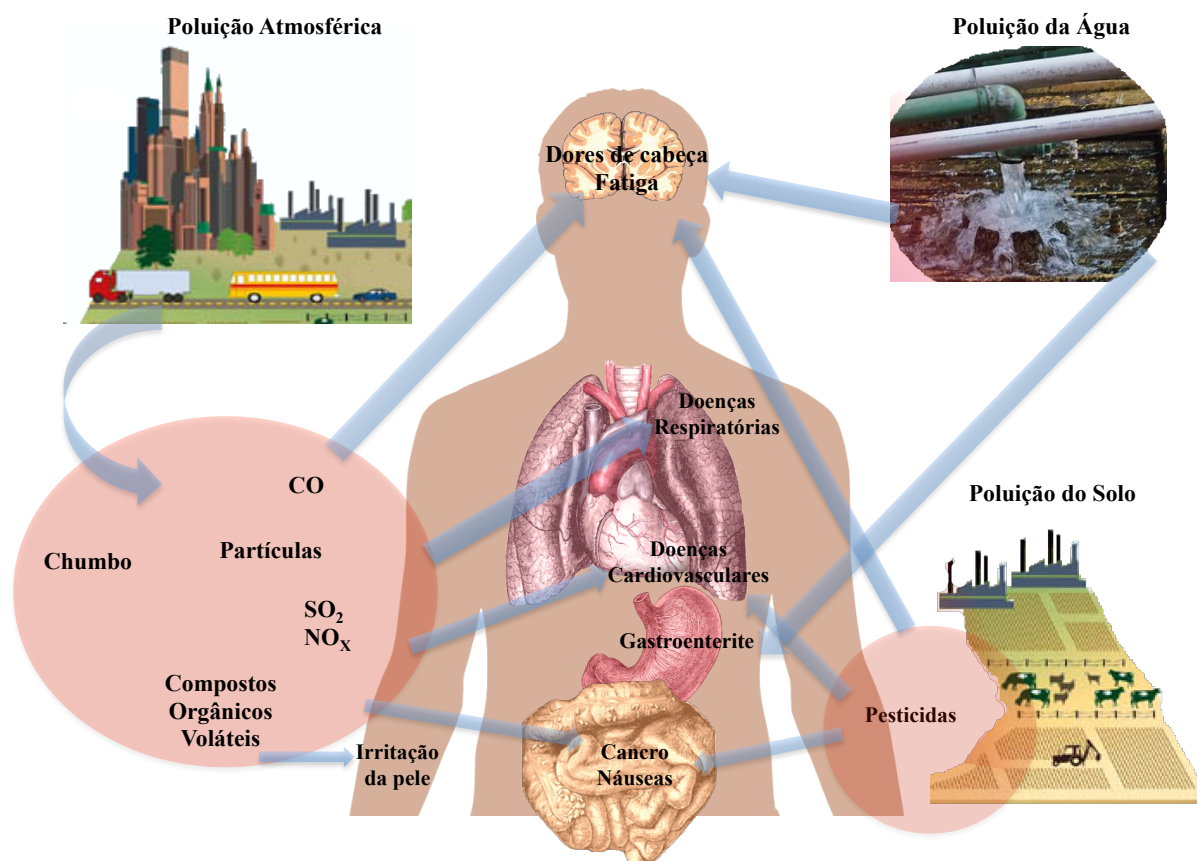


Figura 1.5 – Esquema resumo dos possíveis efeitos da exposição aos pesticidas por parte do Homem.

Existem ainda consequências económicas da utilização de pesticidas que podem-se dividir em investimentos e custos. Os investimentos englobam todos os recursos gastos na investigação e produção de novos pesticidas mais eficazes, mas ao mesmo tempo mais “verdes”. Já os custos englobam todos os gastos no tratamento de pacientes que sofrem de doenças provocados por estes compostos, no reembolso de bens danificados pelos pesticidas e o tratamento do ambiente poluído pelos pesticidas utilizados.³¹

1.2.3 Ácido 2,4 – diclorofenoxiacético

O ácido 2,4 – diclorofenoxiacético, também conhecido pela sua abreviatura 2,4 – D (Fig.1.6), é um herbicida utilizado para controlar o crescimento de ervas daninhas de folha larga.³² 2,4-D é um herbicida membro da família –fenóxido e foi o primeiro herbicida selectivo a ser desenvolvido por quatro grupos de investigação diferentes, trabalhando independentemente uns dos outros, descobriram a classe de herbicidas hormonais, aonde o 2,4-D pertence, nos inícios dos anos 40 com o objectivo de aumentar os rendimentos das culturas durante a guerra.³³

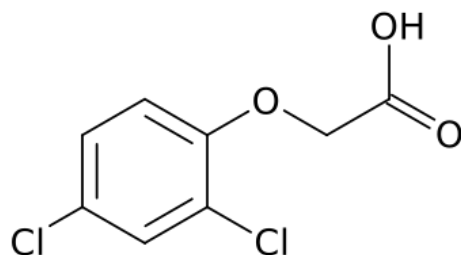


Figura 1.6 – Estrutura química do pesticida 2,4-D.

1.2.4 Métodos actuais de detecção de pesticidas

A detecção de resíduos de pesticidas é efectuada em alimentos, em água, em solos e em produtos registados de forma a garantir a segurança dos consumidores. Assim sendo, os fabricantes de pesticidas são obrigados por lei a desenvolverem métodos analíticos para os seus próprios produtos e estes métodos têm de ser submetidos a organizações governamentais de forma a serem corroborados e só nestas condições é que é possível a comercialização dos produtos.³⁴ Actualmente as técnicas utilizadas no desenvolvimento de ensaios de detecção de pesticidas são maioritariamente electroforeses, cromatografias, ensaios de detecção óptica/colorimétrica e ainda alguns espectros de massa (Fig.1.7).⁷ Técnicas que apesar de serem bastante sensíveis possuem desvantagens que impossibilitam a sua utilização em diversos locais por serem dispendiosas e fixas.⁷



Figura 1.7 – Imagens de equipamentos de técnicas utilizadas na detecção de pesticidas. Da esquerda para a direita apresenta-se equipamento de HPLC, cromatografia capilar gasosa e espectrofotómetro UV/VIS.³⁵

1.3 Bionanotecnologia

1.3.1 Conceitos gerais

A nanotecnologia é uma ciência que se foca no estudo das aplicações de materiais à nanoescala e corresponde a uma junção de diversos ramos da ciência.³⁶

A Bionanotecnologia surge como uma área que conjuga os conhecimentos da Nanotecnologia e da Biotecnologia.³⁶ A base da bionanotecnologia está na utilização conjunta de materiais utilizados na nanotecnologia, como por exemplo as nanopartículas de ouro, com biomoléculas (por exemplo, enzimas, anticorpos e microrganismos).

1.3.2 Descrição geral e propriedades da nanoescala

As nanopartículas são definidas como partículas com dimensões entre 1 e 100 nm que podem ser não cristalinas, um agregado de cristais ou um cristal único.³⁷ Apesar de se considerarem as nanopartículas como uma descoberta da ciência moderna, estas já existiam e eram utilizadas desde o século IX, na Mesopotâmia, por artesões para criar um efeito de brilho em cerâmicas.

Os estudos mais recentes das nanopartículas levaram a descoberta de novas propriedades, que são dependentes do tamanho do material e só se observavam à nanoescala, que são os efeitos de superfície e os efeitos de confinamento quântico.³⁷⁻³⁸ Estes factores afectam a reactividade química e alteram as propriedades mecânicas, ópticas, eléctricas e magnéticas dos materiais.³⁹

Os efeitos superficiais característicos das nanopartículas são o aumento da área de superfície (Fig.1.8-a) e o número de partículas superficiais por unidade de massa de nanopartículas (Fig.1.8-b) quando comparadas com as micropartículas ou as partículas em solução. As nanopartículas ao possuírem uma grande área superficial são ideais para a ocorrência de reacções químicas, o que leva que a reactividade à sua superfície seja mil vezes superior do que a superfície do material não particulado. Os átomos presentes à superfície das nanopartículas possuem menos vizinhos do que os átomos em solução, resultando numa menor energia de ligação por átomo. A diminuição da energia de ligação por átomo vai levar a que o ponto de fusão diminua e que seja proporcionalmente dependente do raio da nanopartículas, ou seja, se o raio aumentar o ponto de fusão também aumenta e vice-versa (Fig.1.8-c).³⁸⁻³⁹

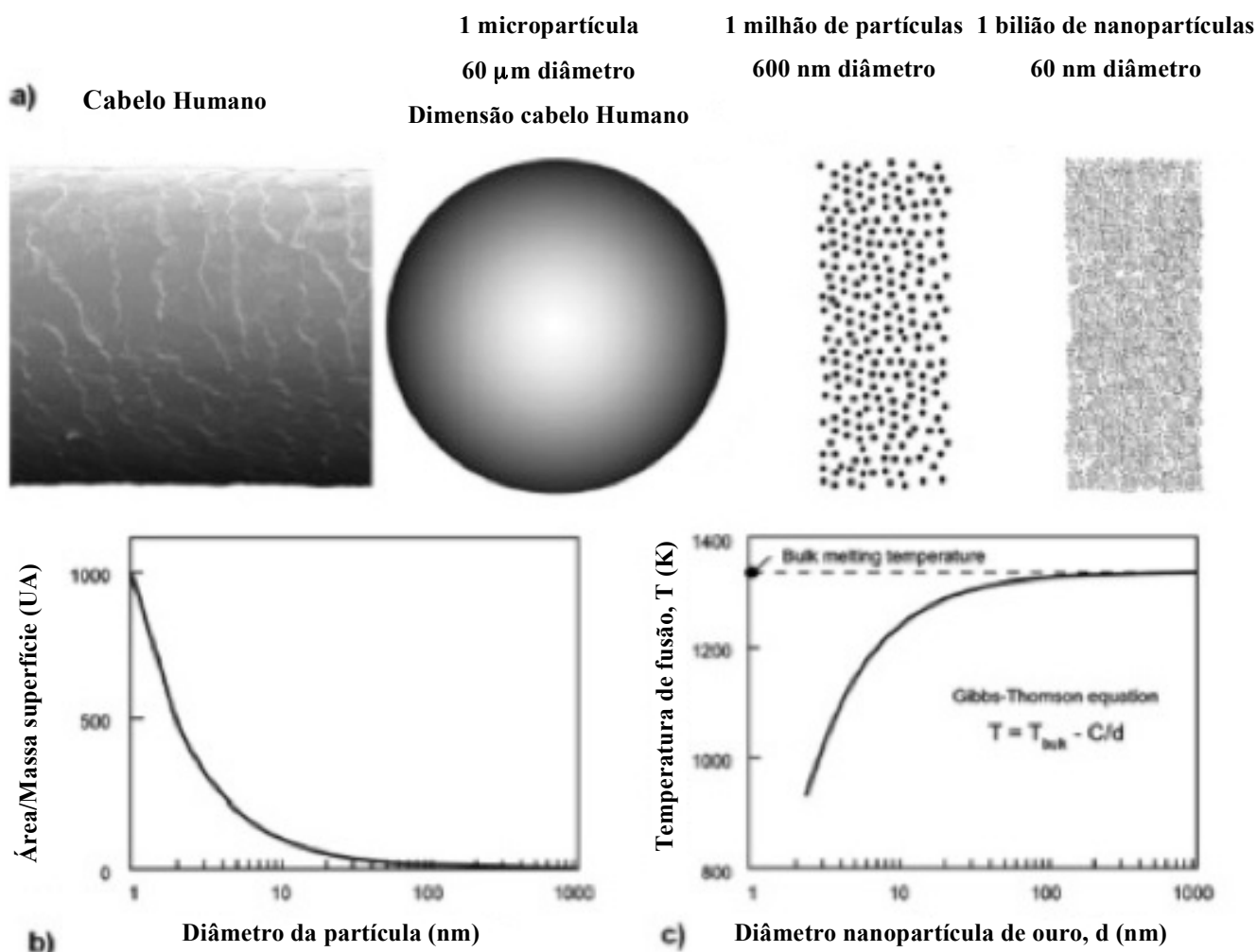


Figura 1.8 – a) Esquema ilustrativo de uma micropartícula com 60 μm , de largura semelhante a um cabelo humano, e o número de nanopartículas de 600 nm e 60 nm de diâmetro, com a mesma massa que a micropartícula. **b)** Relação entre a normalização da área com a massa em função do diâmetro das partículas. **c)** Temperatura de fusão do ouro em função do diâmetro das partículas; a temperatura de fusão de partículas de ouro no material (“bulk melting temperature”) é de 1336 K.³⁹

Os efeitos de movimento quântico estão relacionados com as propriedades físico-químicas do material, uma vez que estes efeitos controlam os movimentos permitidos e proibidos dos electrões.⁴⁰ Quando um electrão fica ligado a um átomo ou uma molécula os seus movimentos tornam-se muito confinados e a quantização torna-se um factor a ter em conta. Os movimentos permitidos aos electrões nas orbitais atómicas ou moleculares possuem energias bem definidas. Quanto menor for o espaço aonde o movimento é permitido, mais forte é o confinamento quântico e maior é a separação de energia entre os movimento proibidos e os movimentos permitidos.⁴⁰

Já os electrões livres, sem restrições, possuem movimentos não quantizados e podem absorver diversas quantidades de energia.⁴⁰ Assim sendo, quando um electrão está confinado num átomo ou molécula os seus movimentos vão ser quantizados.

Nos metais os electrões estão bastante deslocalizados no espaço, uma vez que não existe separação entre as bandas de condução e as bandas de valência, conferindo-lhes assim as suas propriedades condutoras.⁴⁰ Um campo magnético ao incidir sobre um material condutor vai provocar o aparecimento de modos de oscilação compreendidos entre o acoplamento do campo electromagnético com os electrões condutores, denominados de plasmões de superfície⁴¹, que se caracterizam por um forte aumento do campo na interface enquanto o vector do campo eléctrico decai exponencialmente para longe da superfície.⁴¹ Quando o condutor possui pequenas dimensões os efeitos de limite e de superfície tornam-se muito importantes para as propriedades ópticas das nanopartículas metálicas, levando a uma intensa oscilação colectiva de electrões condutores em ressonância com o campo electromagnético incidente, este fenómeno denomina-se de ressonância plasmónica de superfície.⁴¹⁻⁴² A formação da ressonância plasmónica de superfície dá-se quando o campo eléctrico da radiação incidente induz a formação de um dipolo, que oscila em fase com o campo eléctrico de luz incidente, na nanopartícula (Fig.1.9).⁴¹

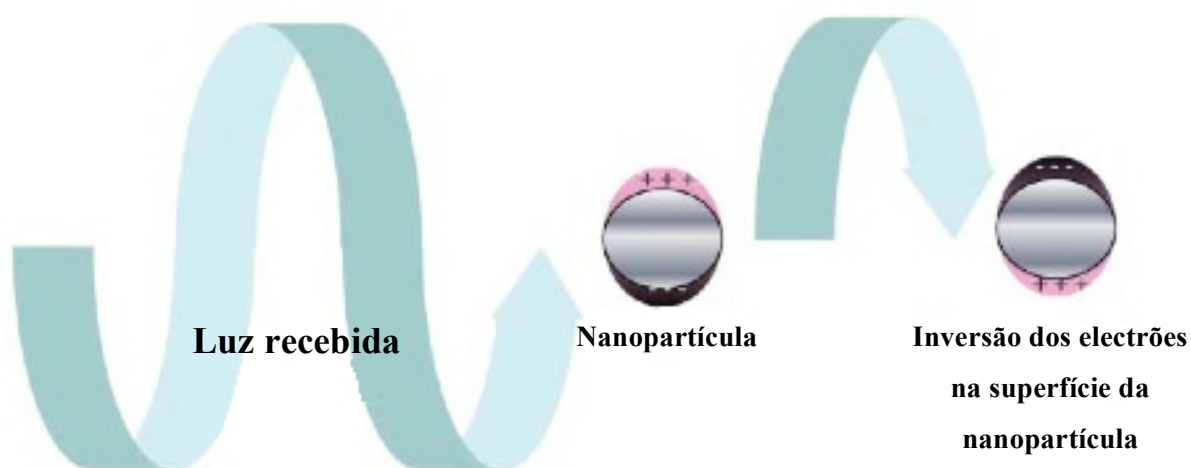


Figura 1.9 – Esquema representativo da interação da radiação electromagnética com uma nanopartícula metálica.³⁷

As nanopartículas de metais nobres a sua frequência da plasmónica situa-se na zona do visível do espectro, o que leva a uma forte absorção de radiação nesta zona espectral que resulta em uma intensa coloração das suspensões coloidais deste tipo de nanopartículas.⁴⁰⁻⁴¹

A posição e a forma da banda plasmónica de superfície no espectro de UV/Visível varia com diversos factores como o tamanho e forma das nanopartículas, interação nanopartícula-nanopartícula e ainda com o índice de refração do meio.⁴⁰⁻⁴²

O tamanho é o factor que tem maior influência na posição da banda plasmónica de superfície, ou seja, nanopartículas de pequenas dimensões a oscilação colectiva dos electrões é muito energética o

que faz com que a banda plasmónica se situe em comprimentos de onda menores comparativamente às nanopartículas de grande dimensões que possuem oscilações colectivas dos electrões pouco energéticas o que leva a banda plasmónica se situe em comprimentos de onda elevados.⁴⁰⁻⁴¹

A forma das nanopartículas é outro factor, assim como o tamanho, que contribui maioritariamente para alterações na posição da banda plasmónica de superfície, contudo alterações mínimas à forma das nanopartículas (proporção entre a largura e a altura) provocam grandes desvios na posição da banda plasmónica. O aumento da proporção entre a largura e altura vai provocar desvios da banda plasmónica para comprimentos de onda maiores, uma vez que a energia de oscilação colectiva dos electrões é menor.^{37, 40-41}

A interação entre nanopartículas é o factor com mais influência nas alterações da banda da plasmónica. Quanto mais próximas se encontram as nanopartículas umas das outras maior será a alteração da forma da banda plasmónica de superfície e a sua posição passará para comprimentos de onda maiores. Este efeito é provocado pela diminuição da distância entre nanopartículas, uma vez que estas passam a comportar-se como nanopartículas de grandes dimensões ou como um filme de metal contínuo levando a que acabem por perder a sua absorção na zona visível do espectro.⁴¹

O último factor que provoca alterações na banda da plasmónica de superfície é o índice de refacção do meio, que é um parâmetro característico de cada meio e varia com a temperatura, a densidade e a pressão. A banda da plasmónica de superfície sofre um aumento de intensidade e um desvio para comprimentos de onda maiores quando o índice de refacção aumenta, já que este vai provocar uma diminuição da velocidade da luz em vácuo diminuindo assim a sua energia.^{40, 42-43}

1.3.3 Nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro (AuNP) são nanopartículas esféricas e estáveis em solução coloidal, de tamanhos variáveis entre 1 e 100 nm. A cor da solução coloidal depende do tamanho médio das nanopartículas que a compõem (Fig.1.10), nanopartículas de pequenas dimensões apresentam uma cor vermelho intenso e à medida que o tamanho médio das nanopartículas vai aumentando a sua cor vai mudando para azul.

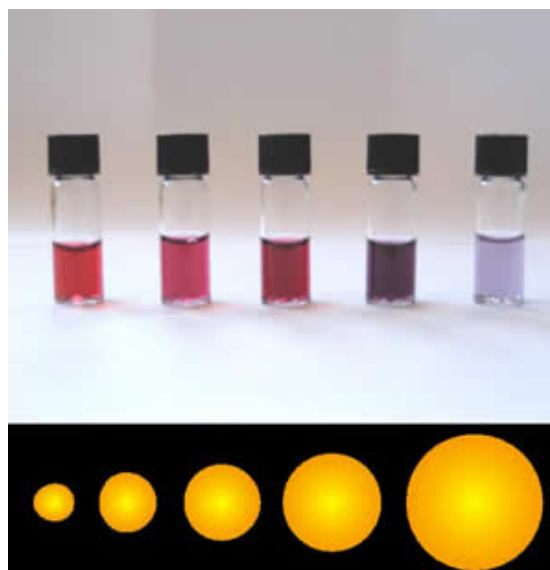


Figura 1.10 – Soluções de nanopartículas de ouro de diferentes tamanhos com as suas cores características.⁴⁴

As nanopartículas de ouro são geralmente sintetizadas em solução por redução do ácido tetracloroaúrico (HAuCl_4) por um redutor, que pode ser forte ou fraco consoante o método utilizado. A solução é sempre mantida em agitação forte durante a reacção, onde os iões de ouro Au^{3+} são reduzidos a ouro metálico Au^0 . Existem vários métodos para sintetizar nanopartículas de ouro, que diferem no agente redutor, no solvente utilizado e ainda no tamanho final das nanopartículas que se obtêm.

O método mais comumente utilizado e mais simples, foi desenvolvido por Turkevich *et al.*⁴⁵. Este método, que é utilizado para produzir nanopartículas monodispersas em água com diâmetros entre os 10 e os 20 nm, baseia-se na redução do ácido tetracloroaúrico pelo citrato de sódio que actua não só como redutor, mas também como agente de revestimento das nanopartículas.

O método de síntese de nanopartículas de ouro por técnicas electroquímicas é, normalmente, utilizando quando se pretende obter nanopartículas sobre algum tipo de superfície, como um sensor ou um eléctrodo. Este método é dos mais utilizados, uma vez que os métodos de aglomeramento de nanopartículas, sintetizadas *à priori*, sobre superfície do eléctrodo provocavam limitações catalíticas à reacção em estudo.^{6, 46} A síntese electroquímica de nanopartículas possui diversas vantagens, uma vez que permite, fazendo alterações intervalo de potencial aplicado, na força iónica e concentração de ouro, controlar as características das nanopartículas obtidas (como o tamanho, a forma, morfologia e espessura).^{46a, 47} Inicialmente é necessário proceder à limpeza dos eléctrodos de forma a que este não contenha impurezas à sua superfície que impossibilitem a adesão das nanopartículas. Este processo de limpeza pode ser efetuado de diversas maneiras como o polimento com alumina ou imersão dos eléctrodos em solução piranha.^{6, 46a, 47} A electrodeposição do ouro sobre os eléctrodos é normalmente feita por voltametria cíclica, variando-se o intervalo de potencial, o número de ciclos ou a velocidade varrimento consoante o compostos de ouro utilizado e/ou o tipo de nanopartículas que se quer obter.^{6-7, 46a, 47} A variação do potencial à superfície do eléctrodo vai ser suficientemente forte para reduzir os sais de ouro em solução, formando-se assim as nanopartículas que ficam adsorvidas à superfície do eléctrodo.

1.3.4 Estabilidade das nanopartículas de ouro

A solução de nanopartículas de ouro é uma solução coloidal, ou seja, as nanopartículas no estado sólido estão perfeitamente estáveis e dispersas numa solução no estado líquido. As nanopartículas de ouro estão dispersas no meio líquido graças às interações electrostáticas repulsivas entre as nanopartículas, repulsões estas provocadas pelo agente de revestimento. No caso das nanopartículas sintetizadas pelo método de Turkevich *et al.*⁴⁸ o citrato funciona como agente redutor e de revestimento conferindo às nanopartículas uma carga superficial negativa levando à existência da repulsão necessária entre as nanopartículas para as manter em suspensão e estáveis.

A estabilidade coloidal da solução de nanopartículas pode ser modificada pela alteração do pH e/ou força iônica da solução. A agregação das nanopartículas é induzida por alteração do pH do meio quando este baixa para valores inferiores aos do pKa do agente de revestimento. Quando tal acontece, o agente de revestimento é protonado e desta forma deixa de conferir carga superficial negativa às nanopartículas que as mantinha estáveis em solução. Desta forma as nanopartículas deixam de apresentar as forças repulsivas que as mantinham afastadas e começam-se aproximar umas das outras até que acabam por agregar. No caso da alteração de força iônica, o seu aumento vai fazer aumentar a quantidade de iões presentes em solução que vão competir com as nanopartículas, pelas moléculas de água que as estão a solvatar. A diminuição da solvatação das nanopartículas vai levar que as cargas negativas à sua superfície fiquem disponíveis para serem canceladas pelos catiões adicionados à solução, o que faz com que a repulsão entre as nanopartículas seja mínima e estas agreguem. Como já foi referido anteriormente, as nanopartículas de ouro com diâmetros de cerca de 20 nm, ao agregarem vão alterar a forma e a posição da banda de plasmónica que vai deslocar-se para comprimentos de onda maiores, o que torna a solução de nanopartículas azul (Fig.1.11).

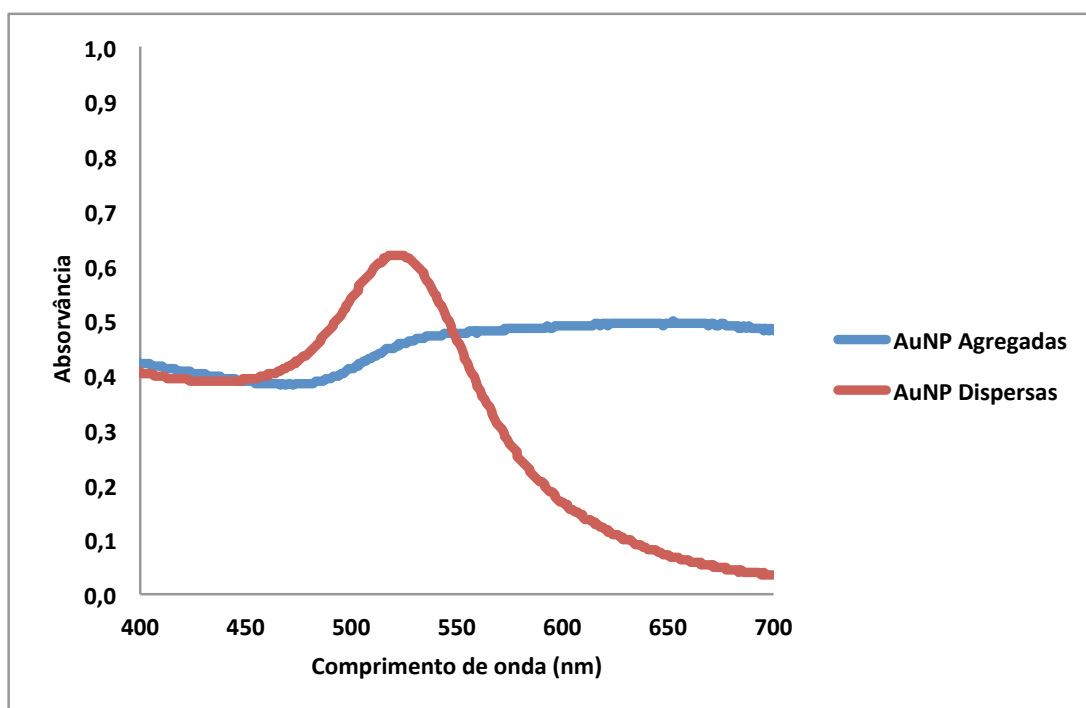


Figura 1.11 – Espectro de UV/Visível de uma solução de nanopartículas de ouro de cerca de 20 nm de diâmetro, dispersas (espectro a vermelho) e agregadas (espectro a azul).

1.3.5 Agentes de revestimento de nanopartículas de ouro

A estabilização das nanopartículas em solução é feita pelo seu agente de revestimento, que lhes confere carga global igual de forma a que exista a repulsão necessária. Existem diversos agentes de revestimento e não é obrigatório utilizar-se aquele com qual as nanopartículas foram sintetizadas. A

substituição de revestimento em nanopartículas é normalmente efectuada quando o revestimento de síntese não torna a partícula muito estável em solução, quando a ligação do agente de revestimento à nanopartícula é fraca e este se liberta facilmente ou quando o agente de revestimento dificulta a ligação de biomoléculas. Grande parte das nanopartículas utilizadas para fins biotecnológicos têm como revestimento moléculas tioladas, pois os grupos tiol têm grande afinidade para o ouro, formando uma ligação estável e muito forte com a nanopartícula.^{42, 49} Os alcanotióis são moléculas muito utilizadas para a conjugação de nanopartículas com proteínas⁴⁹, uma vez que possuem um grupo tiol que se liga covalentemente às nanopartículas e um grupo carboxílico virado para a solução que além de conferir carga negativa uniforme à superfície das nanopartículas, possibilita ainda interacções electrostáticas com biomoléculas.⁴⁹ Entre as moléculas utilizadas como revestimento podem-se destacar os alcanotióis (Fig.1.16), como o ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) e o ácido 3-mercaptopropiónico (MPA), ou pentapéptidos do tipo CALNN (Fig.1.12).

O CALNN é um pequeno péptido composto por uma cisteína, uma alanina, leucina e duas asparaginas. O CALNN foi desenhado de forma a garantir que a molécula possua uma forte afinidade para o ouro, a facilidade de formar por automontagem uma camada densa e impermeável e com um terminal hidrofílico de forma a garantir solubilidade e estabilidade em soluções aquosas. Desta forma, utiliza-se a cisteína para formar uma ligação covalente entre o péptido e o ouro, já que esta possui um grupo tiol na cadeia lateral. A alanina e a leucina, uma vez que possuem cadeias laterais hidrofóbicas, são utilizadas promover a automontagem dos péptidos, através de interacções hidrofóbicas. Por último são utilizadas duas asparaginas, que devido ao grupo amida da sua cadeia, lateral e ao grupo carboxílico livre da asparagina final, conferem carácter hidrofílico necessário para a solubilidade e estabilidade das nanopartículas em soluções aquosas.⁵⁰

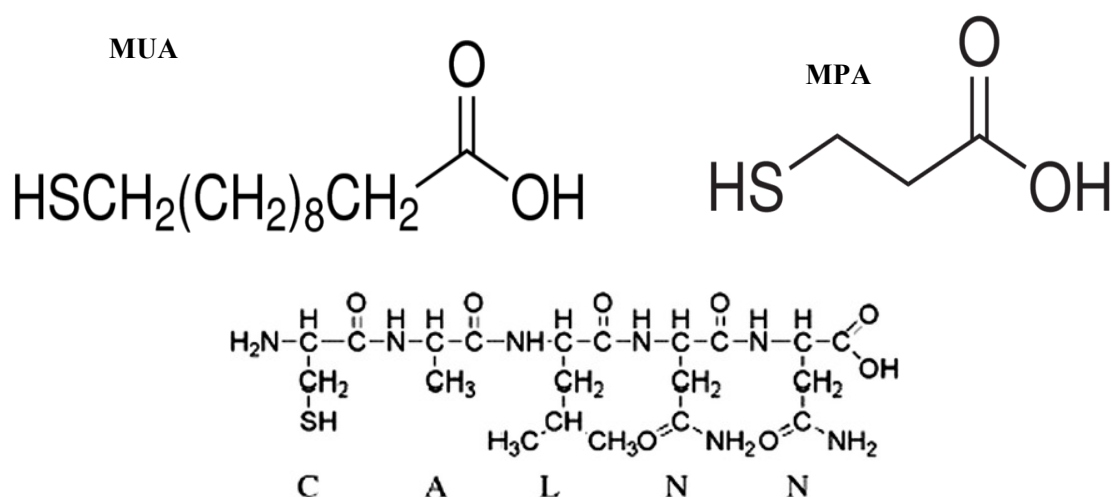


Figura 1.12 – Moléculas utilizadas no revestimento de nanopartículas de ouro para ensaios com biomoléculas. O 11-mercaptoundecanóico (MUA), o 3-mercaptopropanóico (MPA) e o péptido CALNN.

1.4 Tirosinase de *Agaricus bisporus*

1.4.1 Origem e caracterização geral

A Tirosinase (EC 1.14.18.1) é uma enzima extraída para uso científico e alimentar maioritariamente do cogumelo *Agaricus bisporus* (Fig1.13), é a espécie de cogumelo mais comum e consumido em todo mundo, especialmente na Europa e América do Norte de onde é originário.



Figura 1.13 – Imagem do cogumelo da espécie *Agaricus bisporus* de onde é extraída a Tirosinase.

A Tirosinase (Fig.1.14) possui um centro binuclear de cobre que catalisa as reacções de conversão de monofenóis (como a L-Tirosina) ou difenóis (como a L-DOPA) nas correspondentes orto-quinonas, que são mais tarde convertidas em melanina.⁵¹ A melanina é um pigmento presente nas bactérias, nos fungos, nas plantas e nos animais, sendo nestes últimos responsável pela pigmentação da pele e subsequente protecção das radiações solares.⁵² Foram descritas até ao momento quatro genes da Tirosinase do cogumelo, *Agaricus bisporus*, dois dos genes codificam duas Tirosinases de 64 kDa (gene *ppo1* e gene *ppo2*).⁵³ Recentemente foram descritos os outros dois genes codificam outras duas Tirosinases de 66 e 68 kDa (gene *ppo3* e *ppo4*).⁵⁴

A Tirosinase é normalmente encontrada na forma de uma proteína tetramérica com um peso molecular de 120 kDa e é composta por duas subunidades de 43 kDa (subunidades H) e duas subunidades de 14 kDa (subunidades L).^{51, 55} No entanto apenas se detectou actividade enzimática nas subunidades H, isoladas do *Agaricus bisporus*.⁵⁶ No que diz respeito às subunidades L ainda não foi revelada qualquer função para as mesmas.⁵⁷

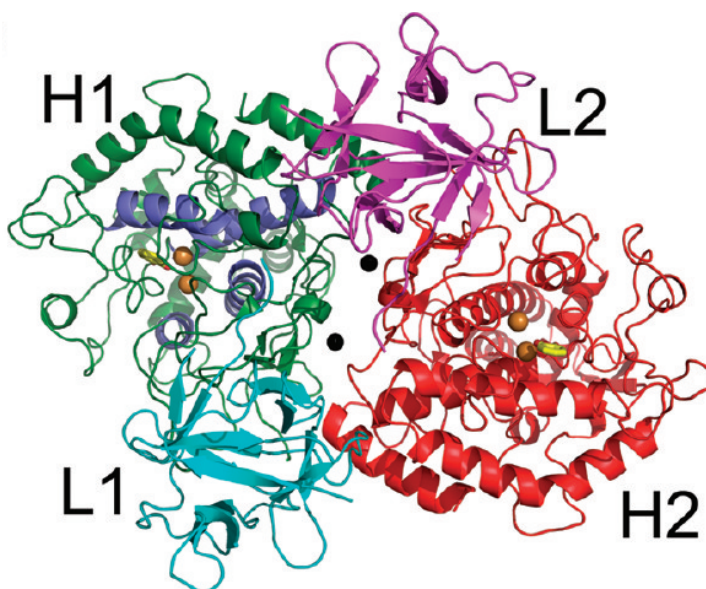


Figura 1.14 – Estrutura tridimensional obtida por difracção de raios-X da Tirosinase de *Agaricus bisporus*. Estão identificadas as quatro subunidade características desta enzima, duas subunidades H e duas subunidades L. As subunidades H ligam-se as L, ligação H-L, sendo que a H1 liga com a L1 e a H2 liga com a L2.⁵¹

1.4.2 Actividade da Tirosinase

A actividade da Tirosinase baseia-se na oxidação de compostos fenólicos para a produção de orto-quinonas poder ser efectuada por duas vias consoante o substrato disponível.⁵⁸ A Tirosinase para oxidar monofenóis (como por exemplo, a L-Tirosina) segue a via da cresolase (Fig.1.15), via específica para a oxidação de monofenóis. No entanto se invés de um monofenol, o substrato presente for um difenol a Tirosinase segue a via da catecolase (Fig.1.16), via específica para a oxidação de difenóis.⁵⁸ Quando o substrato é um monofenol a Tirosinase pela via da cresolase transforma-o num difenol e de seguida pela via da catecolase transforma-o numa orto-quinona, caso os substrato presente seja já um difenol, a Tirosinase segue apenas a via da catecolase e forma logo a orto-quinona.^{51, 58}

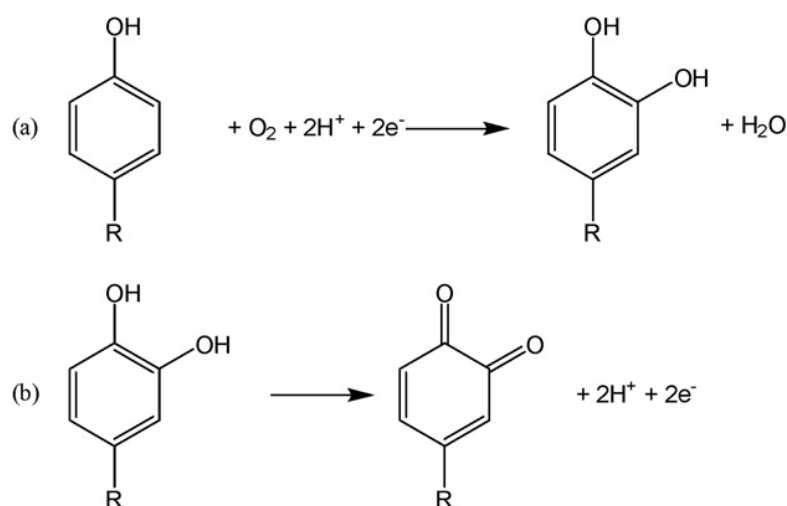


Figura 1.15 –Tirosinase – via da Cresolase. a) passo inicial onde ocorre a oxidação de um monofenol para difenol; b) oxidação do difenol, formado no passo a), para a orto-quinona respectiva.⁵⁹

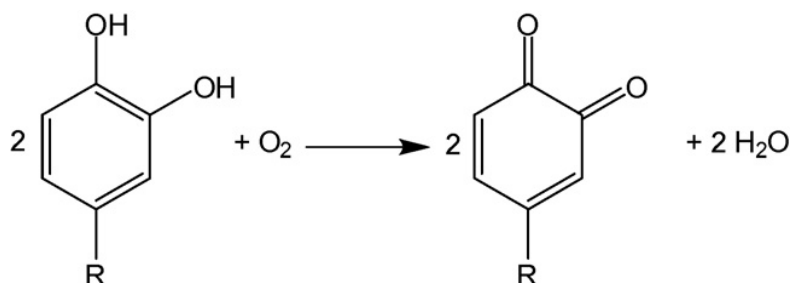


Figura 1.16 –Tirosinase – via da Catecolase. A Tirosinase oxida directamente duas moléculas de um difenol e dá origem a duas moléculas da orto-quinona correspondente.⁵⁹

1.5 Determinação da concentração de pesticida através da percentagem de inibição da enzima

A concentração de pesticida, em amostras reais, pode ser determinada através da percentagem de inibição da enzima. Para tal, é necessário construir uma recta de calibração com concentrações conhecidas do pesticida em estudo, como já foi descrito por Kim, *et al.*^{6, 46b, 60} e Ren, *et al.*⁶¹. Inicialmente é necessário testar o biossensor de forma a determinar a sua sensibilidade, limites de detecção e estabilidade do biossensor com o tempo. A determinação dos limites de detecção e sensibilidade é, normalmente, efectuada por amperometria, cronoamperometria ou voltametria cíclica. A percentagem de inibição é, usualmente, determinada por amperometria, medindo a corrente obtida da reacção da enzima com o substrato antes e após adição de pesticida em volumes e concentrações conhecidas. De seguida com os dados obtidos faz-se um gráfico da percentagem de inibição da enzima, calculada através da equação 1.1 (em que A_0 = corrente obtida sem pesticida presente na solução e A_i = corrente obtida com pesticida presente na solução do ensaio),⁶ em função da concentração de pesticida e escolhem-se dos pontos experimentais, aqueles que formam uma correlação linear entre a percentagem de inibição e a concentração de pesticida. Calcula-se a equação da recta formada por esses pontos e é esta recta que é a recta de calibração a utilizar para determinar a concentração de pesticidas em amostras reais.^{6, 46b, 60-61}

$$I(\%) = \left(\frac{A_0 - A_i}{A_0} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 1.2})$$

1.6 Eléctrodos de óxido de estanho dopados com fluoreto

O óxido de estanho dopado com fluoreto (FTO) é um filme muito utilizado em aplicações da optoelectrónica, como células solares, diodos de emissão de luz, em vidro inteligente e podem ainda ser utilizados na construção de sensores para a detecção de gases,⁶² de pH⁶³ e na detecção de poluentes ambientais.⁶⁴ Comparativamente aos filmes de óxido de estanho dopados com índio (ITO), os filmes de FTO possuem diversas vantagens como baixo custo de produção, resistência química e os componentes utilizados na sua manufactura existem em grandes quantidades.⁶⁵

A produção dos filmes de FTO já foi efectuada por diversos métodos, como a deposição de pirólise por pulverização (SPD),⁶⁶ a deposição por *sputtering*,⁶⁷ a deposição por vapores químicos⁶⁸ ou a deposição por pulverização com assistência de chama.⁶⁵

1.7 Técnicas utilizadas no desenvolvimento do biossensor

1.7.1 Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é uma técnica electroquímica na qual se varia linearmente o potencial do eléctrodo de trabalho, medindo-se a corrente gerada. Esta técnica consiste em efectuar vários ciclos de potencial na janela de potencial escolhida, na qual é detectável a reacção em estudo e estudar a sua evolução ao longo do tempo.⁶⁹

Em voltametria cíclica é utilizado normalmente um sistema de três eléctrodos, em que um é de referência, um de trabalho e um auxiliar. O eléctrodo de trabalho é geralmente constituído por um material condutor e que não reaja com a solução para que não ocorram reacções secundárias que possam interferir com o sistema nem alterar a constituição do eléctrodo de forma a que o impossibilite de manter a corrente gerada com o eléctrodo de trabalho.⁶⁹

Em voltametria cíclica denomina-se de velocidade de varrimento a variação de potencial em função do tempo, este parâmetro possui as unidades de Volt por segundo (V/s). Nesta técnica electroquímica aplica-se o potencial entre o eléctrodo de trabalho e o eléctrodo de referência e mede-se a corrente entre o eléctrodo de trabalho e o eléctrodo auxiliar. Os dados obtidos por voltametria cíclica são designadas de voltamogramas e representam a variação da corrente em função do potencial. Quando, durante um ciclo de potencial, é atingido o potencial de oxidação ou redução do analito é gerado um pico de corrente de redução ou oxidação do analito, dependendo do sentido que o potencial é aplicado. Quando o potencial é invertido e se a reacção redox do analito for reversível irá formar-se um pico de corrente de polaridade inversa ao pico observado anteriormente.⁶⁹

Para se poder tirar o máximo partido da voltametria cíclica, é necessário escolher a melhor janela de potencial possível, de modo a que o analito seja electroquimicamente activo nesta, e que o analito apresente reversibilidade no processo redox.

A reversibilidade do analito no processo redox pode ser determinada analisando os voltamogramas obtidos. A partir do voltamograma podem-se retirar os valores do potencial de redução ou catódico (E_{pc}) e do potencial de oxidação ou anódico (E_{pa}) e a diferença entre estes dois potenciais tem um valor ideal consoante o número (n) de electrões que são transferidos na reacção (Equação 1.2).⁶⁹

$$|E_{pc}-E_{pa}| = \frac{0,059 V}{n} \quad (\text{Equação 1.2})$$

A reversibilidade pode ainda ser avaliada pela razão da intensidade de corrente dos picos catódico (I_{pc}) e anódico (I_{pa}), caso a reacção seja reversível as intensidades de corrente dos dois picos são iguais e a razão entre elas é igual a 1.

No caso de o processo ser reversível é possível retirar informação termodinâmica da reacção electroquímica específica para o analito em estudo. O potencial formal ($E^{\circ'}$) é o potencial a meio entre o potencial de redução e de oxidação e este parâmetro é específico para cada analito, ou seja, a determinação deste parâmetro é mais uma forma de corroborar que a reacção que se observa no voltamograma é do analito em estudo e não de um composto desconhecido.

1.7.2 Microscopia electrónica de varrimento

A microscopia electrónica de varrimento (SEM) utiliza um feixe de electrões com elevada energia para gerar uma variedade de sinais à superfície de amostras sólidas. Os sinais resultantes das interações electrão-amostra revelam informação acerca da textura, da composição química, da estrutura cristalina e orientação dos componentes da amostra (Fig.1.17). Na maioria das aplicações desta técnica, a informação é obtida apenas da área seleccionada da superfície da amostra em forma de imagens de duas dimensões. As áreas seleccionadas podem variar de 1 cm até 5 μ m de largura no modo de scan comum do SEM, a amplificação da amostra pode ir desde 20x até 30000x e com uma resolução espacial dos 50 aos 100 nm. O SEM possui ainda a capacidade de seleccionar apenas um ponto da amostra e efectuar uma determinação qualitativa ou semi-quantitativa da composição química, da estrutura cristalina e orientação dos cristais da amostra.⁷⁰

Em SEM os electrões acelerados levam consigo elevadas quantidades de energia cinética, esta energia é dissipada em diversos tipos de sinais quando os electrões chocam com a amostra sólida e criam interações com esta. Os sinais obtidos pela interacção electrão-amostra incluem sinais de electrões secundários (produtores das imagens de SEM), electrões *backscattered* (BSE), electrões *diffracted backscattered* (EBSD, que são utilizados na determinação de estruturas cristalinas e na orientação dos cristais), fotões (contêm informação acerca do raio-x característico e são utilizados para análise elemental e estruturas de raio-x), luz visível e calor. A informação dos electrões secundários e dos *backscattered* é utilizada para criar as imagens a duas dimensões da amostra, no entanto a informação dos electrões secundários é mais acerca da morfologia e topográfica da amostra enquanto que a informação dos electrões *backscattered* é mais acerca da composição de amostras com várias fases. A informação de raio-x advém das colisões inelásticas entre os electrões incidentes e os electrões das orbitais internas dos átomos da amostra.⁷⁰

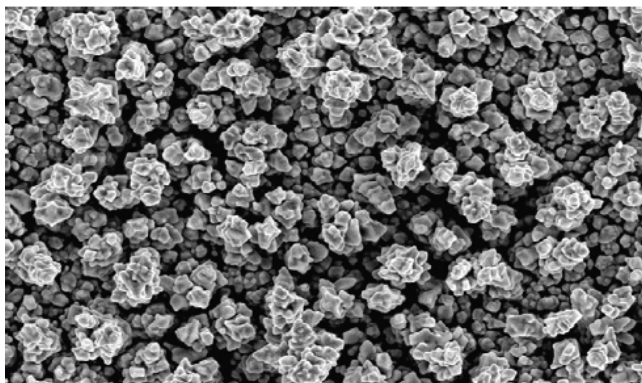


Figura 1.17 – Imagem típica de SEM de um eléctrodo com nanopartículas de ouro electrodepositadas.^{46a}

1.7.3 Espectroscopia fotoelectrónica de Raio-X

A espectroscopia Fotoelectrónica de Raio-X (XPS), também denominada de Espectroscopia Electrónica de Análise Química (ESCA) é uma técnica muito utilizada na investigação da composição química de superfícies.

A técnica de XPS inicialmente excita uma pequena área da amostra a analisar com um feixe de Raio-X (Fig.1.18). A energia dos electrões excitados – fotoelectrões – é determinada por um *Concentric Hemispherical Analyser* (CHA) e este detector cria um espectro com os picos de energia dos fotoelectrões. A energia de ligação necessária para libertar cada electrão da amostra pode ser determinada em cada pico do espectro e esta energia é característica para cada elemento. Contudo, a energia de ligação e a forma do pico podem ser alteradas pelo estado químico do átomo de onde o electrão foi emitido. Desta forma, o XPS pode também fornecer a informação dos tipos de ligação química presentes na amostra.⁷¹

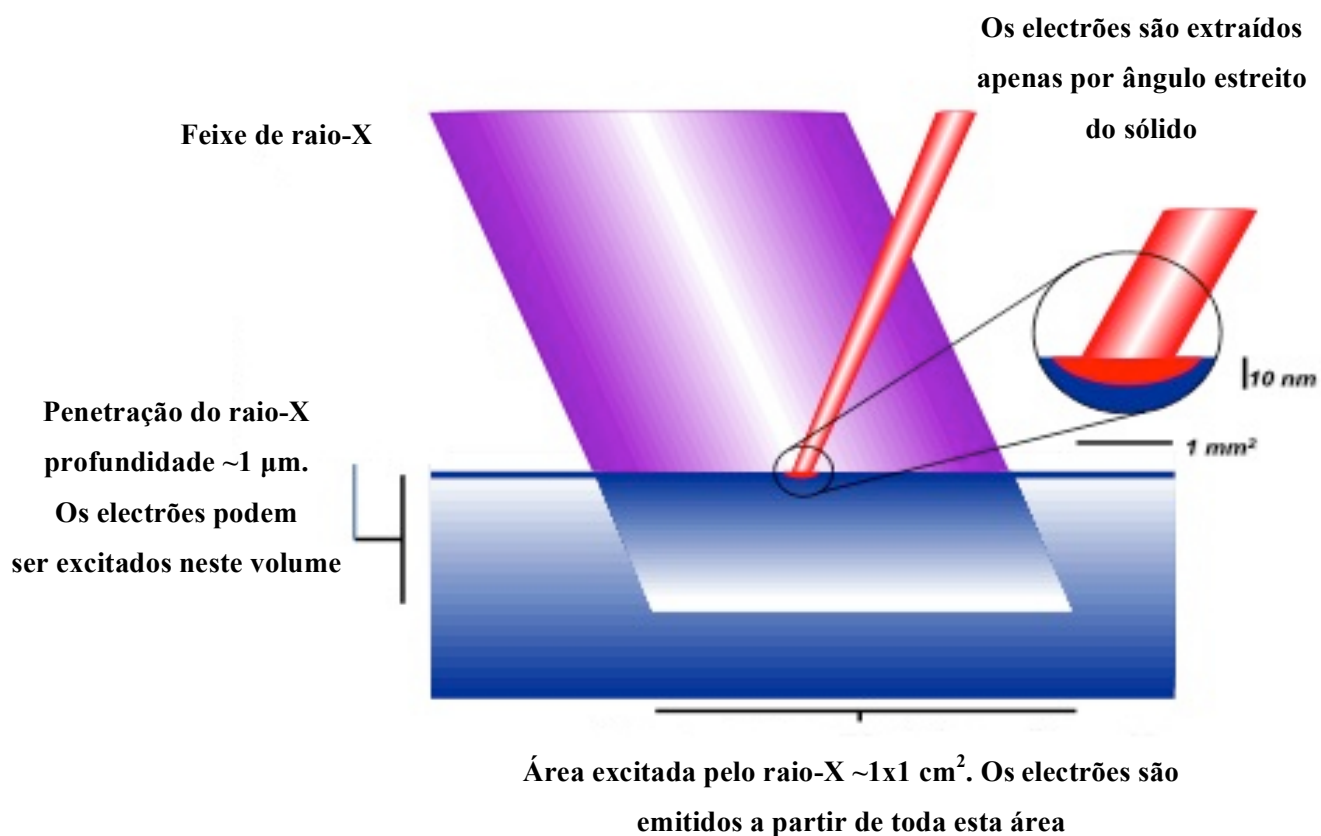


Figura 1.18 – Esquema representativo da técnica de XPS, demonstrando a zona excitada pelo feixe de Raio-X e os acontecimentos posteriores a esse excitação.

Capítulo II: Parte Experimental

2 Procedimentos Experimentais

2.1 Síntese de nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro foram sintetizadas a partir de um método já desenvolvido anteriormente por Turkevich J, *et al.*⁴⁸. Antes de se iniciar a síntese todo o material foi lavado com água régia (mistura de 1:3 de ácido nítrico (Sigma-Aldrich ou Panreac, 65%) com ácido clorídrico (Carlos Erba Reagents, 37%)), de seguida foi lavado com uma solução de hidróxido de sódio (Sigma-Aldrich, 98%) e por fim passado por água milli-Q (18,35 MΩ). Colocaram-se 200 mL de água milli-Q no balão de síntese e adicionaram-se 173 µL de ácido tetracloroaurico (Sigma-Aldrich, 99,99%) e levou-se a solução a refluxo. Adicionaram-se, de seguida, 50 mL de uma solução de citrato de sódio 1% (p/v) (Sigma-Aldrich, 99,9%) e deixou-se reagir durante 15 minutos. Retirou-se o balão da placa de aquecimento e deixou-se arrefecer à temperatura ambiente.

2.2 Ensaios de estabilidade das nanopartículas – Força iónica e pH

Os ensaios de estabilidade das nanopartículas foram utilizados para determinar o intervalo de pH e força iónica a utilizar durante os ensaios de forma a que não existisse agregação das nanopartículas.

No ensaio de estabilidade com o aumento da força iónica preparou-se onze amostras às quais se adicionou 900 µL de solução *stock* de nanopartículas a 13,4 nM (concentração final de 3 nM em 1 mL) e variou-se os volumes adicionados de uma solução de cloreto de sódio (Panreac, 99,5%) 1 M e de água milli-Q, de forma a nunca ultrapassar os 100 µL finais, de forma a obter uma gama de concentrações de cloreto de sódio no volume final de 1 mL dos 0 aos 100 mM. Após a preparação de cada amostra leu-se a absorvância no intervalo de comprimentos de onda dos 200 – 800 nm de forma a observar variações no comportamento da banda das nanopartículas.

No ensaio de estabilidade com variação do pH preparou-se sete *ependorfs* aonde se adicionou 1 mL da solução *stock* de nanopartículas a 3 nM variou-se o pH do 2 ao 8 adicionando pequenos volumes de uma solução stock de ácido clorídrico 0,1 M ou 1 M, no caso dos valores de pH mais baixos, e leu-se a absorvância no intervalo de comprimentos de onda dos 200 – 800 nm de forma a observar alterações na banda de plasmónica das nanopartículas.

2.3 Determinação da concentração de proteína

O ensaio do ácido bicinonínico, desenvolvido anteriormente por P. K. Smith, *et al.*⁷², foi utilizado para determinar a quantidade de proteína total presente nas soluções de Tirosinase. Preparou-se uma solução de ácido bicinonínico (Sigma-Aldrich) e sulfato de cobre (Sigma-Aldrich), numa razão 50:1. A recta de calibração foi feita com albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich), 1 mg/mL, com um intervalo de concentração dos 0 aos 24 µg/mL. As amostras de Tirosinase foram preparadas adicionando a 1 mL da solução ácido bicinonínico – sulfato de cobre 30 µL da solução de Tirosinase (Sigma-Aldrich, T3824). Após a preparação das amostras em *ependorfs*, estas foram colocados numa estufa a 37 °C, durante 30 minutos, a incubar. De seguida mediram-se as absorvâncias das amostras, num espectrofotómetro (Varian – Cary 50-Bio; Cary WinUV software –Simple Reads), construiu-se a recta de calibração para a BSA e determinou-se a quantidade de proteína existente nas amostras de Tirosinase.

2.4 Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio – SDS-PAGE

A electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi utilizada para avaliar a pureza da Tirosinase para o trabalho a desenvolver posteriormente. Preparou-se um gel resolvente de acrilamida 12%, para tal, misturou-se água milli-Q (18,35 MΩ), acrilamida mix (Biorad, 30%), SDS (Sigma-Aldrich, 98,5%), tampão TRIS pH = 8,8 (mistura de TRIS (Fluka, 98%), SDS e HCl (Carlos Erba Reagents, 37%)), APS (Sigma-Aldrich, 98%) e TEMED (Biorad). Após a adição de todos os compostos a mistura foi colocada nos vidros de electroforese a polimerizar. Enquanto a polimerização ocorria fez-se o gel de carga com acrilamida 5%, misturando-se água milli-Q, acrilamida mix, SDS, tampão TRIS pH = 6,8, APS e TEMED. De seguida colocou-se a mistura por cima do gel de acrilamida 12%, já polimerizado, de forma a obter polimerização em cima.

As amostras e os tampões foram diluídos em tampão de amostra (que contém glicerol (Panreac, 98%), Beta-Mercaptoetanol (Sigma), SDS, Azul bromofenol (Biorad) e tampão TRIS pH 6,8) e as amostras colocadas em água a ferver durante 2 minutos. De seguida as amostras e o padrão foram colocados nos poços do gel, que foi inserido na tina de electroforese e esta cheia com tampão de corrida TRIS (glicina (Riedel-de Haën, 98,7%), TRIS e SDS). Após todo o equipamento (Biorad Multi-PROTEAN TetraCell) estar montado correu-se a electroforese durante 45 minutos a 180 V (Biorad PowerPac Basic). No final do tempo colocou-se o gel a corar em Azul de Coomassie (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos. Retirou-se o gel para a solução de descoloração (mistura de ácido acético (Sigma-Aldrich, 99,8%), metanol (Sigma-Aldrich, 99,8%) e água milli-Q)) até as bandas se tornarem completamente visíveis.

2.5 Electroforese em gel de poliacrilamida nativo – Teste de actividade da Tirosinase

O protocolo para realizar o gel de PAGE nativo só difere do protocolo de SDS-PAGE descrito no ponto 1.4 no que diz respeito à adição de SDS para fazer os géis e o tampão de corrida, adicionando-se água milli-Q como substituinte do volume respectivo. Enquanto o gel correu, durante 1 hora a 180 V, preparou-se uma solução 1 mM de L-Tirosina (Sigma-Aldrich; 98%). Quando a electroforese terminou retirou-se o gel do equipamento e cortou-se o mesmo ao meio, uma metade foi colocada na solução de Azul Coomassie a corar e a outra metade foi colocada na solução de L-Tirosina. Passados os 30 minutos o gel que estava no Azul Coomassie foi colocado na solução de descoloração. O gel que estava na solução de L-Tirosina permaneceu na mesma durante a noite, de forma a revelar completamente a cor das bandas.

2.6 Ensaios de Actividade da Tirosinase

A actividade da Tirosinase foi determinada utilizando a L-Tirosina como substrato da Tirosinase. Estes ensaios foram feitos tendo como referência o protocolo da Sigma-Aldrich.⁷³ Os ensaios foram feitos tanto para a Tirosinase livre como para bionanoconjugados de Tirosinase, mantendo sempre uma concentração final de Tirosinase de 50 U nos 3 mL de ensaio.

Os ensaios foram realizados a vários valores de pH, do 4 ao 8, de forma a verificar a estabilidade da Tirosinase e dos bionanoconjugados e se estes últimos traziam alguma vantagem à cinética da Tirosinase em valores de pH mais ácidos. A Tirosinase livre e os bionanoconjugados de Tirosinase foram sempre preparados no dia anterior ao do ensaio em tampão fosfato 10 mM a pH = 7, de maneira a manter as mesmas condições entre ambos.

2.6.1 Preparação dos bionanoconjugados de Tirosinase

Os bionanoconjugados de Tirosinase foram preparados diluindo as nanopartículas em tampão fosfato 10 mM a pH = 7 para se obter uma concentração final de nanopartículas para 1 mL de 1,017 nM. Esta concentração é a necessária para obter bionanoconjugados com uma razão de 9 mg de Tirosinase para 1 nmol de nanopartículas, garantindo que, as nanopartículas estão completamente revestidas de Tirosinase (estes resultados foram obtidos pelo Mestre João Luz, em 2012). Após diluir as nanopartículas adiciona-se o agente de revestimento de forma a que no final a mistura fique a proporção de 5000 moléculas de MUA para uma nanopartícula de ouro ou 1000 moléculas de CALNN para uma nanopartícula de ouro (as razões AuNP:MUA, AuNP:CALNN foram determinadas pelo Mestre João Luz, em 2012). Finalmente, adiciona-se a Tirosinase de modo a ficar com a concentração de 50 U em 1 mL e deixa-se a encubar durante a noite no frio (a 4 °C).

2.7 Desenvolvimento do biossensor de Tirosinase

O desenvolvimento do biossensor de Tirosinase compreende duas fases principais, nomeadamente, a construção do biossensor e os ensaios de caracterização do mesmo. A construção do biossensor está dividida em cinco fases, a limpeza dos eléctrodos de óxido de estanho dopados com fluoreto, de forma a que não existam contaminantes à superfície dos eléctrodos que possam prejudicar a electrodeposição do ouro. A segunda fase do processo é a electrodeposição do ouro com a formação de uma camada de nanopartículas, que tem como funções o aumento de sensibilidade do sensor e também é utilizada como intermediário de ligação entre os eléctrodos e a Tirosinase. A terceira fase do processo é a modificação da superfície dos eléctrodos com ácido 3-mercaptopropiónico (MPA), composto que vai ligar as nanopartículas de ouro à Tirosina através dos seus grupos –tiol (que liga às nanopartículas) e –carboxílico (que vai efectuar ligações peptídicas com resíduos da Tirosinase, através de química de reticulação). A quarta fase, compreende a ligação do 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida/N-Hidroxisuccinamida (EDC/NHS) aos grupos carboxílico do MPA, estes dois compostos são adicionados para promover a ligação dos grupos amina das cadeias laterais dos aminoácidos da Tirosinase aos grupos carboxílico do MPA. A quinta e última fase é a ligação da Tirosinase aos grupos carboxílicos do MPA com a libertação do EDC/NHS (Fig. 2.1).

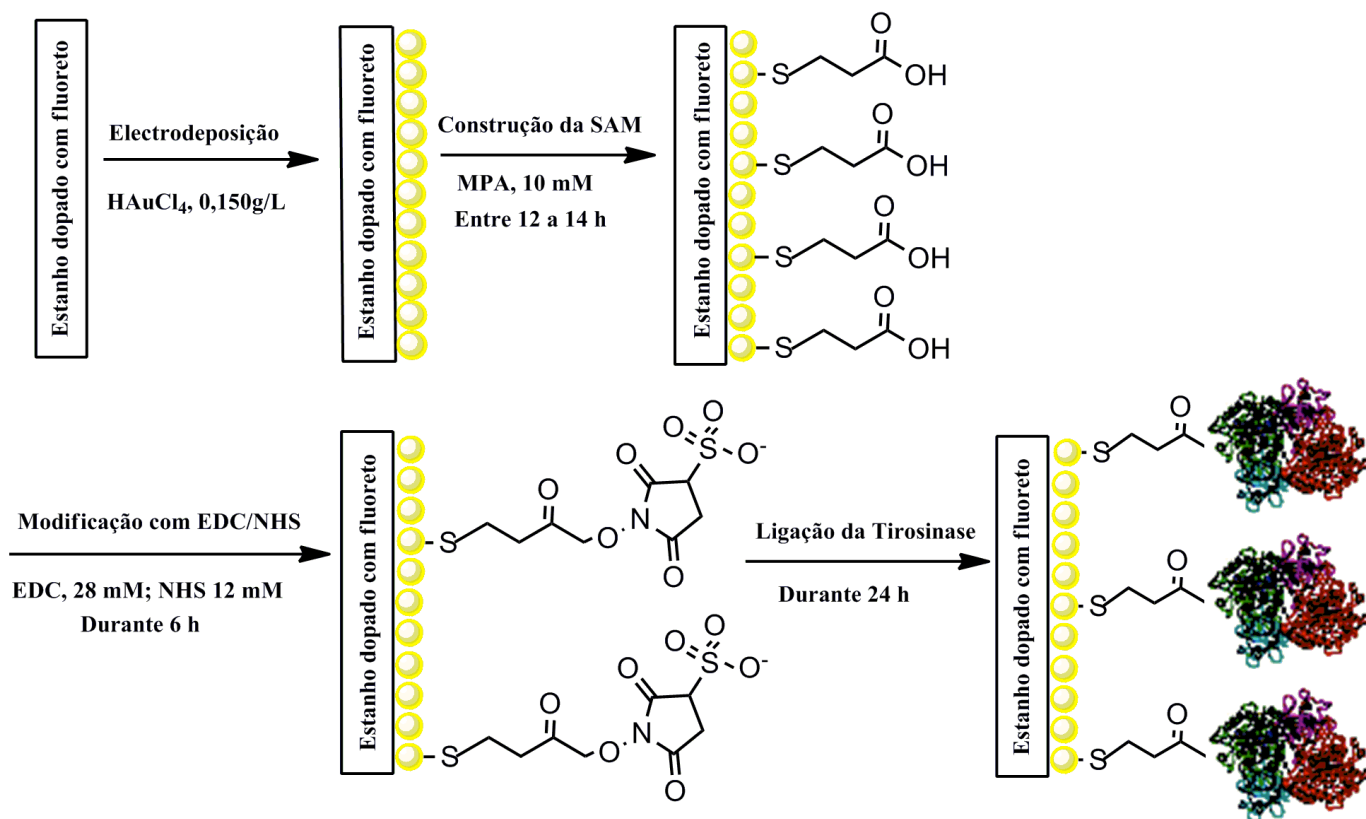


Figura 2.1 – Esquema do desenvolvimento do biossensor, demonstrando as várias etapas que são necessárias para a sua construção.

A caracterização do biossensor é feita, por voltametria cíclica, SEM e XPS, após a adição de cada componente ao eléctrodo de forma a confirmar se o composto adicionado ficou ligado com sucesso e se está activo (no caso da Tirosinase). A ocorrência de mudanças na superfície do eléctrodo ou no seu perfil electroquímico são os resultados indicadores do sucesso da ligação do componente adicionado ao eléctrodo. Após a construção do biossensor inicia-se a sua caracterização em termos de limites de detecção, concentração de saturação, reversibilidade do sistema, concentração óptima de substrato em função do sinal obtido e zona de detecção linear do biossensor.

2.7.1 Pré-tratamento dos eléctrodos de FTO

Os eléctrodos são inicialmente cortados, da matriz na qual são moldados, e são colocados numa solução piranha (mistura 1:1 de peróxido de hidrogénio (Panreac, 30% (p/v)) com ácido sulfúrico (Panreac, 96%)), durante 20 minutos, de forma a limpar todas as impurezas existentes na superfície dos mesmos. Passados os 20 minutos, o eléctrodos foram lavados com água milli-Q e colocados numa solução de activação (mistura 1:1:4 de peróxido de hidrogénio, hidróxido de amónia (Sharlau, 25 (p/p)) e água milli-Q) durante 10 minutos. Passado este tempo, foram de novo lavados com água milli-Q e colocados numa placa de petri prontos a utilizar.

2.7.2 Electrodeposição da solução de ouro sobre os eléctrodos de FTO

Preparou-se uma solução de ácido tetracloroaurico 0,44 mM (estes resultados foram obtidos pelo Mestre Jonnatan Julival, em 2011) em tampão fosfato 10 mM e nitrato de potássio (KNO_3) 0,1 M, este último como electrólito suporte. Utilizou-se o eléctrodo de platina e o eléctrodo de prata/cloreto de prata (3 M KCl) como eléctrodo secundário e padrão, respectivamente. Montou-se a célula e os eléctrodos e colou-se 3 mL da solução de ouro no seu interior, de seguida deixou-se desarejar durante 10 minutos com azoto e 2-3 minutos entre cada deposição (3 mL de solução dão para fazer deposição em dois eléctrodos). A electrodeposição foi realizada numa janela de potencial dos 0 aos -1 V vs Ag/AgCl (3 M KNO_3), com uma velocidade de varrimento de 0,01 V/s e com cinco ciclos de deposição.

2.7.3 Verificação do sucesso da electrodeposição do ouro sobre os eléctrodos através de ensaios de voltametria cíclica utilizando ferricianeto de potássio como analito padrão

O sucesso da electrodeposição do ouro foi verificado fazendo ensaios de voltametria cíclica com uma solução 1 mM de ferricianeto de potássio. Colocou-se 3 mL dessa solução na célula de

electroquímica e deixou-se desarear durante 10 minutos com azoto e 2-3 minutos entre cada ensaio. De seguida, fez-se ensaios de voltametria cíclica com uma janela de potencial dos 0,5 aos -0,05 V vs Ag/AgCl (3 M KNO₃) e utilizaram-se velocidades de varrimento dos 0,01 V/s até os 0,1 V/s.

2.7.4 Modificação da superfície dos eléctrodos de ouro depositado com MPA seguido de uma solução de EDC/NHS

De maneira a formar uma ligação covalente entre a Tirosinase e o eléctrodo de FTO, foi necessário fazer modificações a superfície do mesmo, para tal preparou-se uma solução 10 mM de MPA (Sigma-Aldrich, 99%) em etanol absoluto (Panreac, 99,9%), na qual se mergulharam os eléctrodos AuNP-FTO durante 14 horas. De seguida lavaram-se os eléctrodos com água milli-Q e colocados numa solução aquosa de 28 mM EDC (Sigma-Aldrich) e 12 mM de NHS (Sigma-Aldrich, 97%) por um período de 6 horas.

2.7.5 Ligação da Tirosinase ao eléctrodo

A ligação da Tirosinase aos eléctrodos foi feita, após este terem permanecido na solução de EDC/NHS. Preparou-se uma solução 1500 U/mL de Tirosinase em tampão fosfato 10 mM e mergulharam-se os eléctrodos durante 24 horas a 4 °C. Passadas as 24h os eléctrodos foram passados para um goblet com uma solução de tampão fosfato 10 mM a pH = 7 e ficaram prontos a serem utilizados.

2.7.6 Verificação do sucesso da ligação da Tirosinase aos eléctrodos através de ensaios de voltametria cíclica utilizando ferricianeto de potássio como analito padrão e catecol como substrato da Tirosinase

O procedimento dos ensaios de voltametria cíclica com o ferricianeto de potássio já foi descrito no ponto 2.7.3. Para os ensaios com o catecol, como substrato da Tirosinase, foi necessário preparar uma solução 1 mM deste composto em tampão fosfato 10 mM a pH = 7 e electrólito suporte. Para os ensaios de voltametria cíclica com catecol colocaram-se 3 mL da solução deste substrato na célula e arejou-se a solução com oxigénio durante 10 minutos e 2-3 minutos entre cada ensaio. Os ensaios foram feitos numa janela de potencial dos 0,5 aos -0,11 V vs Ag/AgCl (3,5 M KNO₃), utilizando as velocidades de varrimento 0,05 V/s e 0,1 V/s.

2.7.7 Caracterização dos eléctrodos: AuNP-FTO, MPA-AuNP-FTO e Tirosinase-AuNP-FTO através de microscopia electrónica de varrimento e de espectroscopia fotoelectrónica de raio-x

A análise XPS realizou-se utilizando uma unidade Kratos AXIS Ultra HSA, com software de aquisição e análise de dados VISION. A análise foi efectuada com uma fonte de raios X monocromática de Al K α (1486.7 eV), a operar a 15kV (90 W), no modo FAT (Fixed Analyser Transmission), e com uma energia de passagem de 40 eV para as regiões e 80 eV para o wide (survey). A aquisição de dados foi realizada a uma pressão inferior a 1×10^{-6} Pa e foi utilizado um sistema de neutralização de carga integral. A modelação dos espectros foi realizada utilizando o programa XPSPEAK41, em que foi efectuado um ajuste de picos com uma forma Gaussiana-Lorentziana e a subtracção do fundo tipo Shirley.

2.7.8 Ensaios de voltametria cíclica com o biossensor utilizando o catecol como substrato da Tirosinase e o pesticida 2,4 – D como inibidor da sua actividade

Os ensaios de voltametria cíclica com a adição de pesticida têm o mesmo procedimento descrito no ponto 2.7.6., com a diferença que entre cada ensaio se adicionou uma quantidade conhecida de uma solução de pesticida. A adição de pesticida foi feita de forma a que a concentração inicial, nos 3 mL de ensaio, fosse 0,0001 nM até à concentração em que se verificou que os voltamogramas já não possuíam diferenças, ou seja, que a Tirosinase já estava completamente inibida. Para estes ensaios prepararam-se várias soluções de pesticida, por diluições progressivas, com concentrações desde 250 nM até 1 mM.

2.7.9 Determinação da concentração de pesticida através da percentagem de inibição da enzima

A recta de calibração da percentagem de inibição da Tirosinase em função da concentração de pesticida foi obtida através do gráfico da percentagem de inibição da enzima (equação 1.1) em função da concentração de pesticida. As percentagens de inibição foram calculadas através das correntes catódicas obtidas por voltametria cíclica para cada ensaio, calculou-se a média dos vários ensaios a cada concentração de pesticida e traçou-se o gráfico das percentagens de inibição calculadas em função da concentração de pesticida de onde se retirou a equação da recta (em ng/mL).

Capítulo III: Apresentação Discussão de Resultados

3 Apresentação e Discussão de Resultados

3.1 Determinação da pureza da Tirosinase e das condições óptimas de pH e força iónica para os ensaios dos bionanoconjugados e desenvolvimento do biossensor.

Antes de se iniciar o desenvolvimento do biossensor foi necessário observar o comportamento da actividade catalítica da Tirosinase, através de ensaios com bionanoconjugados de Tirosinase isolados em solução. Para tal, sintetizaram-se as nanopartículas, calculou-se a sua concentração e determinaram-se as condições de pH e força iónica mais favoráveis à execução dos ensaios sem que as nanopartículas agregassem. Por último foi necessário verificar a pureza da Tirosinase adquirida .

3.1.1 Determinação da concentração das nanopartículas de ouro sintetizadas

A determinação da concentração e da dimensão média das nanopartículas sintetizadas foi feita seguindo um procedimento já descrito por W. Haiss, *et al.*⁷⁴. Realizou-se um espectro das nanopartículas utilizando um espectrofotómetro (Varian – Cary 50-Bio; Cary WinUV software – Scan) com uma diluição 1:4 em água milli-Q (Fig.3.1).

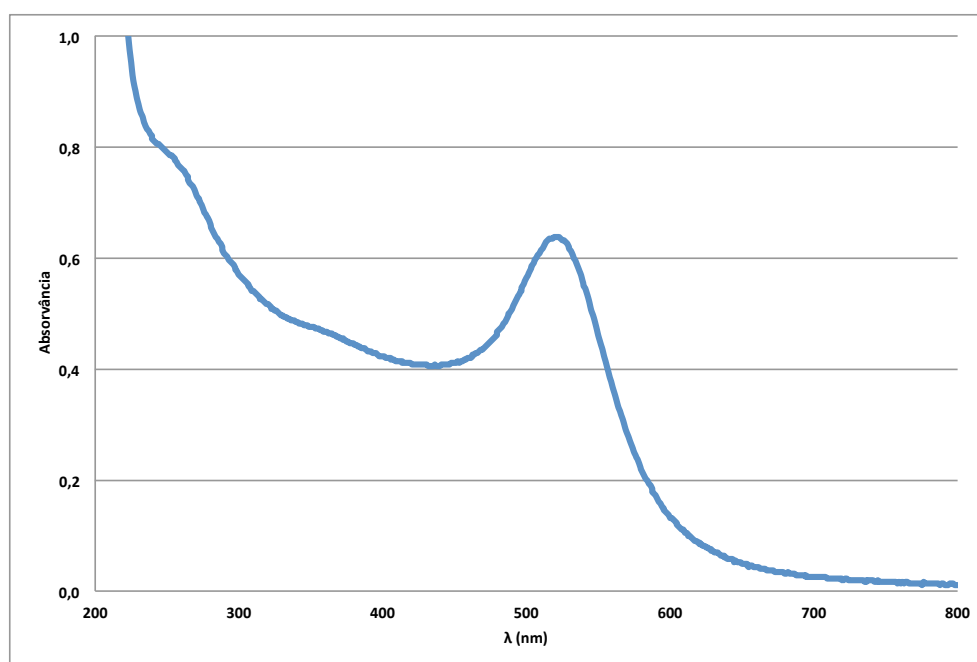


Figura 3.1 – Espectro UV/Vis de 200 – 800 nm de nanopartículas de ouro sintetizadas com uma diluição 1:4 em água milli-Q.

De seguida, retiraram-se os valores de absorvância correspondente ao comprimento de onda da plasmónica de ressonância de superfície (A_{spr}) e correspondente ao comprimento de onda de 450 nm (A_{450nm}). Utilizando a equação 1⁷⁴ determinou-se o diâmetro das nanopartículas.

$$\frac{A_{spr}}{A_{450nm}} = 0,3335 \times \ln(\text{diâmetro}) + 0,7301 \quad (\text{Equação 2})$$

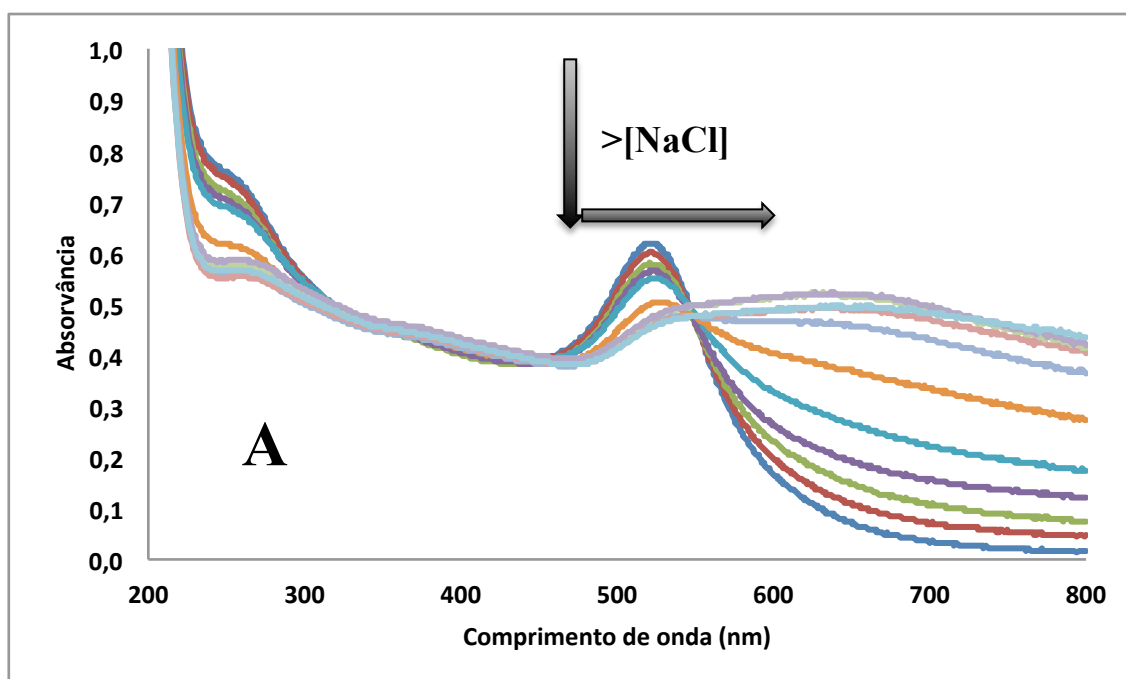
Com o diâmetro das nanopartículas já determinado e com uma tabela que relaciona os diâmetros das nanopartículas com o seu coeficiente de extinção molar (ϵ)⁷⁴ calculou-se a concentração da solução sintetizada (equação 2).

$$c = \frac{A_{450nm}}{\epsilon_{450nm}} \quad (\text{Equação 3})$$

As nanopartículas de ouro sintetizadas durante todo o trabalho experimental tinham em média entre 11 e 12 nm e a concentração da síntese estava entre os 15 e os 16 nM.

3.1.2 Ensaios de agregação de nanopartículas de ouro com o aumento da força iónica

As nanopartículas de ouro foram utilizadas para a formação de bionanoconjugados com a Tirosinase para a realizam de ensaios de actividade. Assim sendo, foi necessário caracterizar a agregação das nanopartículas em função da força iónica . Foram utilizadas nanopartículas com três agentes de revestimento diferentes (Citrato, MUA e CALNN), logo efectuaram-se ensaios de agregação com o aumento da força iónica para os três tipos de revestimento (Fig.3.2).



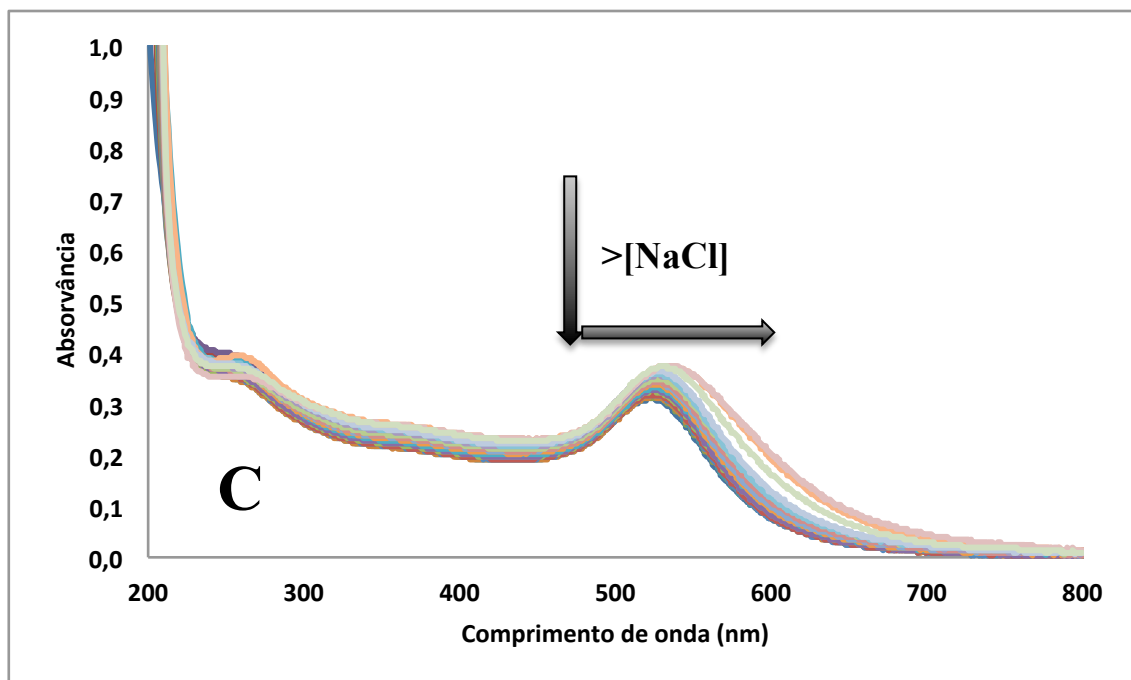
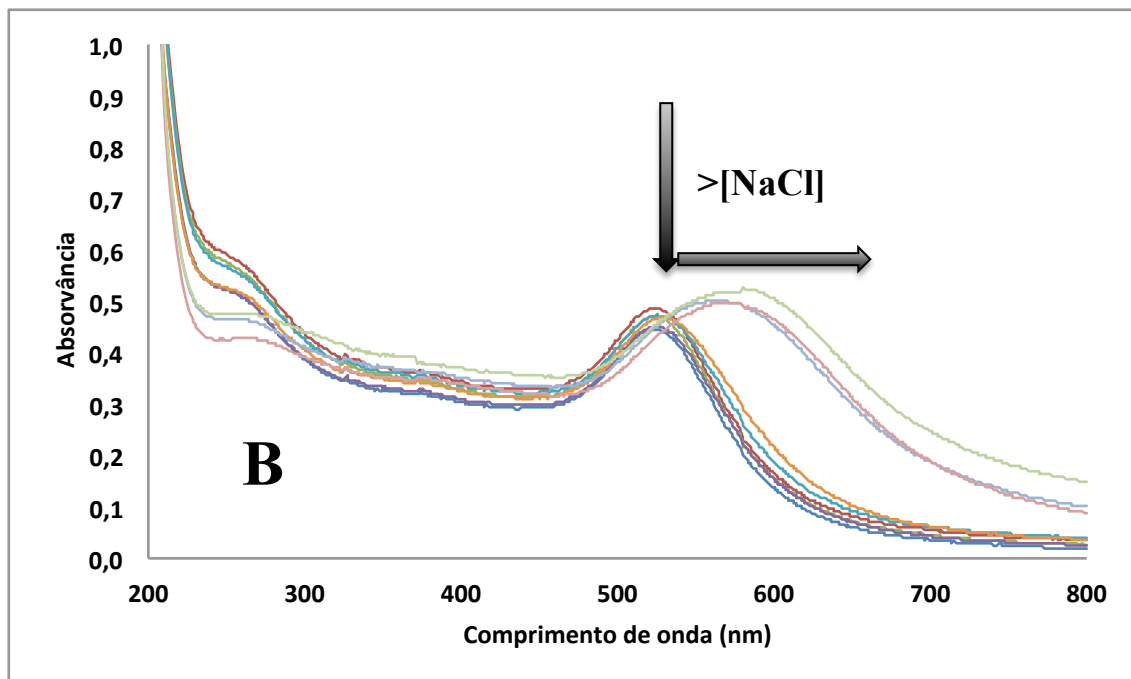


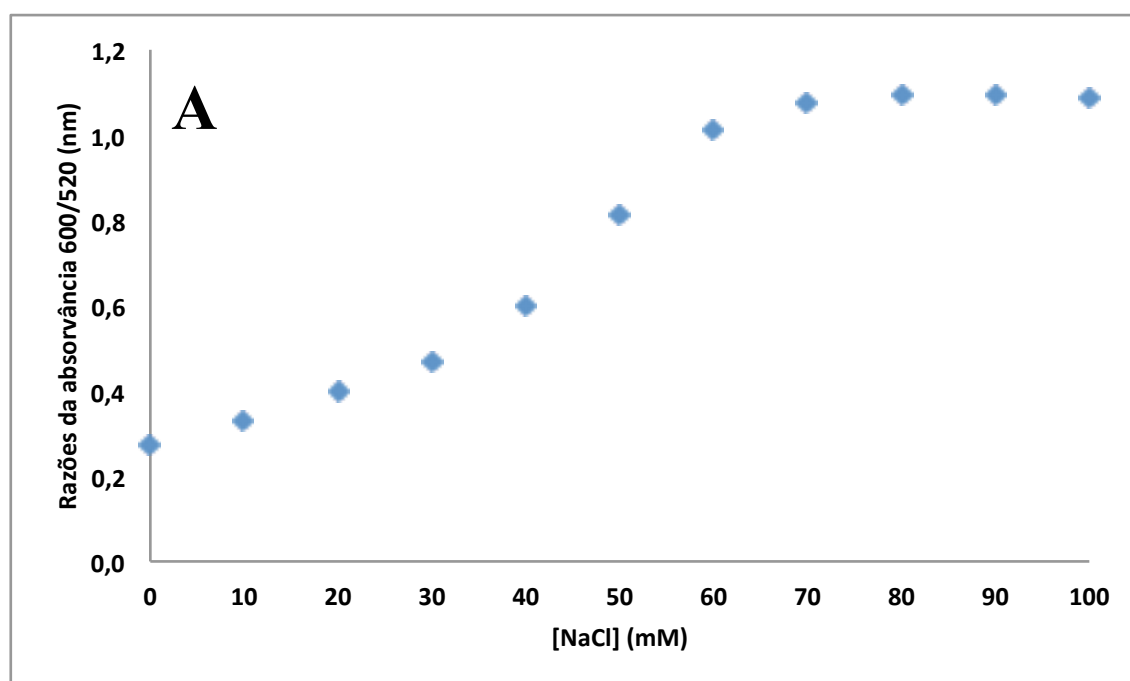
Figura 3.2 – Espectros de UV/visível de AuNP (3 nM), com diferentes agentes de revestimento, com o aumento da concentrações de NaCl. A – AuNP; B – AuNP-MUA; C AuNP-CALNN

Nos espectros UV/Visível das AuNP apresentados na figura 3.2. observaram-se alterações com o aumento da concentração de NaCl na solução. As alterações ocorreram ao nível da banda da plasmónica de superfície, situada inicialmente a 520 nm (comprimento de onda esperado para uma solução de ouro coloidal com nanopartículas de cerca de 10-20 nm de diâmetro), que sofreu um desvio para comprimentos de onda mais elevados. Este desvio indica que as nanopartículas começaram a agregar e que a solução coloidal começou a ficar instável, sendo observado para nas nanopartículas

com os três agentes de revestimento diferentes. Com o aumento da força iónica passaram a existir mais iões na solução, o Na^+ e o Cl^- , que competiram com as nanopartículas pelas moléculas de água e desta forma as nanopartículas perderam a sua esfera de hidratação. Com a perda da esfera de solvatação as nanopartículas ficaram expostas aos iões Na^+ que interagiram com estas, cancelando as cargas negativas existentes à sua superfície o que levou a que as nanopartículas perdessem a repulsão electrostática entre si e deixassem de estar estáveis numa solução coloidal. Após a perda das forças de repulsão as nanopartículas tornaram-se demasiado instáveis e formaram agregados tornando a solução dispersa. O aumento do tamanho dos agregados desloca a banda da plasmónica para um comprimento de onda mais elevado, perto da zona do infravermelho.

Com o desvio da banda da plasmónica observa-se uma mudança de cor das soluções de vermelho para azul, como o aumento da força iónica, funcionando como outro indicador da formação de agregados de nanopartículas.

De forma a determinar qual a concentração mínima de NaCl que provocou a agregação das nanopartículas, com os três agentes de revestimento diferentes, calculou-se um parâmetro indicativo da agregação das nanopartículas – Razão de agregação. O cálculo deste parâmetro foi efectuado fazendo o quociente entre a absorvância ao comprimento de onda em que, na forma completamente agregada, a absorvância é máxima pela absorvância ao comprimento de onda em que, na forma não agregada, a absorvância é máxima. Normalmente calcula-se a razão de agregação pelo quociente $\text{Abs } 600\text{nm}/\text{Abs } 520\text{ nm}$ (Figura 3.3).



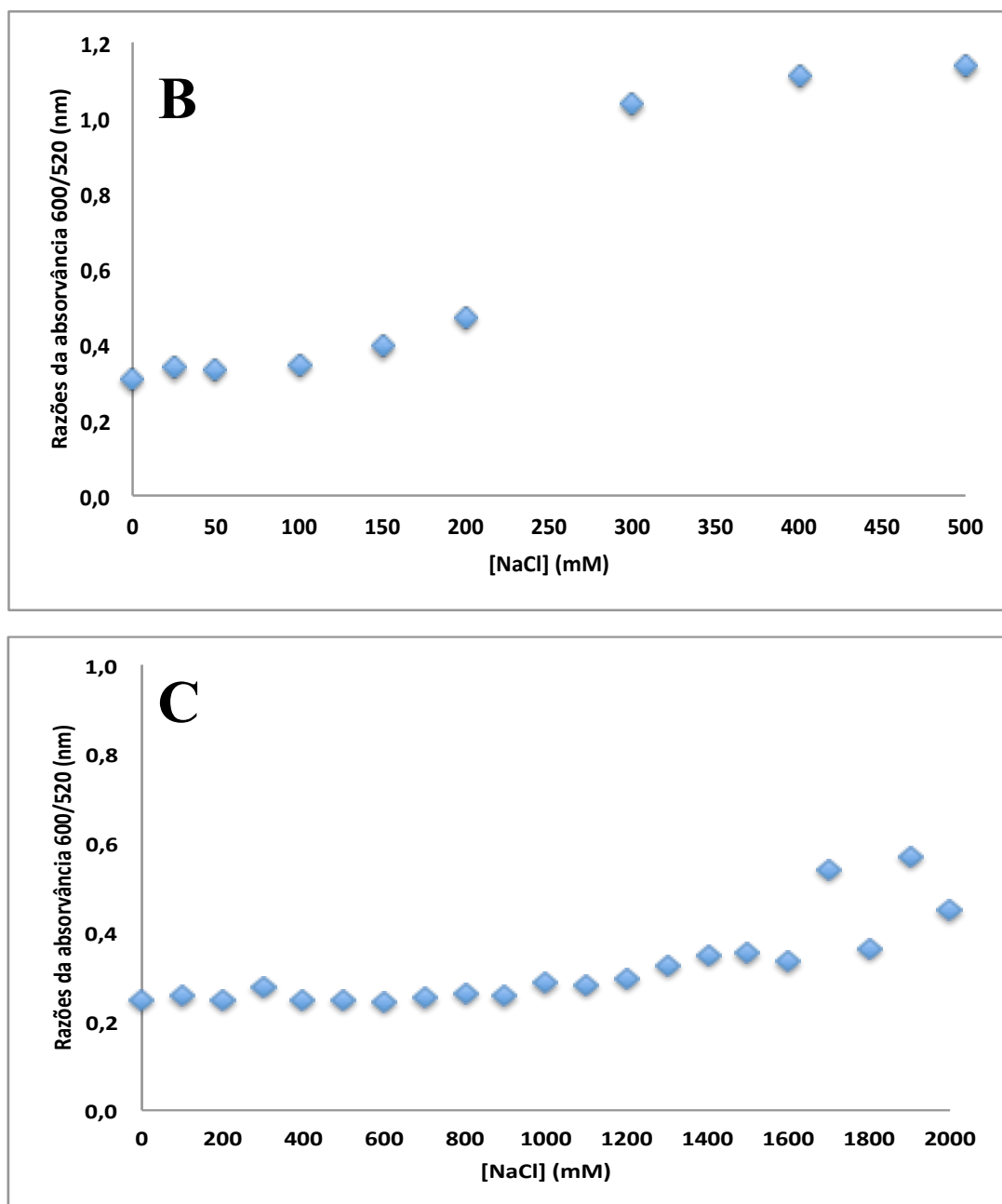


Figura 3.3 – Gráficos das razões de agregação das AuNP com o aumento da concentração de NaCl, para vários agentes de revestimento. A- AuNP; B – AuNP-MUA; C – AuNP-CALNN

Analisaram-se os gráficos apresentados na figura 3.3 e observaram-se diferenças nos perfis de agregação entre os três tipos de agente de revestimento.

No espectro A da figura 3.3, que corresponde às AuNP, a razão de agregação sem adição de NaCl é de 0,3 que é o valor indicativo de uma solução coloidal de AuNP. A razão de agregação manteve-se mais ou menos constante nos 0,3 até se atingir uma concentração de NaCl entre 20-30 mM, indicando que a forma não agregada das AuNP era a predominante em solução. Subiu-se a concentração de NaCl até se ter atingido o ponto de meia titulação, correspondendo à igualdade entre a

espécie não agregada e de espécie agregada. A partir deste valor de concentração de NaCl a espécie agregada passou a ser a espécie maioritária na solução.

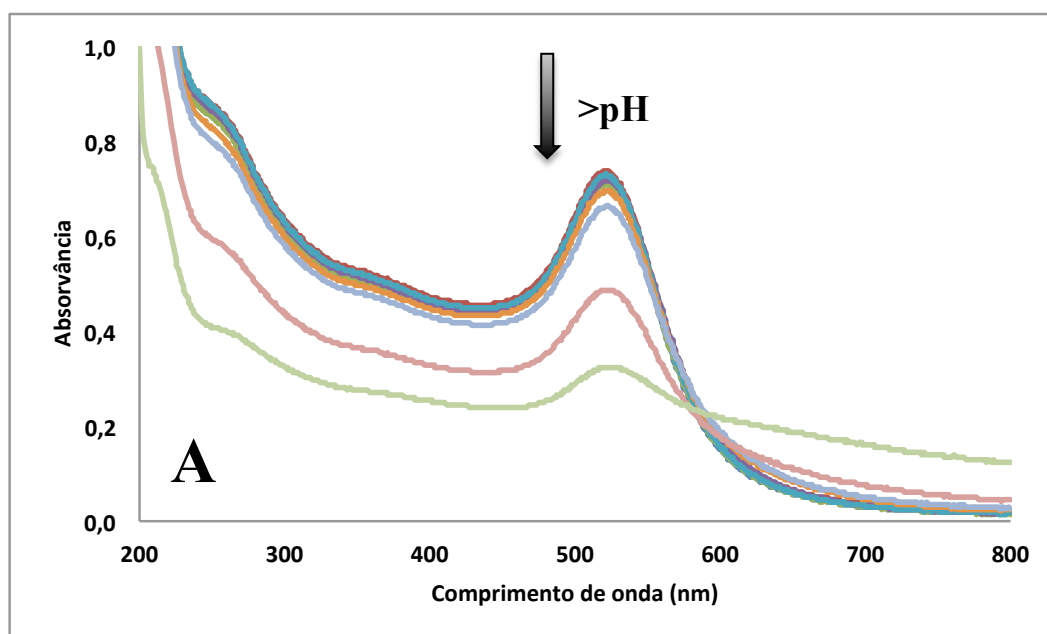
No espectro B da figura 3.3, respeitante às AuNP-MUA, a razão de agregação sem qualquer adição de NaCl é de 0,35, valor indicativo de uma solução coloidal de AuNP-MUA. A razão de agregação manteve-se mais ou menos constante até se atingir uma concentração de NaCl de 200 mM, o que indicou que a forma não agregada de AuNP-MUA estava presente em maior quantidade em solução. Assim que a concentração de NaCl subiu acima dos 250 mM a razão de agregação ascendeu a valores superiores a 0,5, ou seja, a partir desta concentração de NaCl a forma de AuNP-MUA que predominava solução era a agregada.

Por último no espectro C da figura 3.3, que diz respeito às AuNP-CALNN, a razão de agregação sem adição de NaCl é de 0,25, valor que indicativo de uma solução de AuNP-CALNN coloidal. A razão de agregação não sofreu alterações significativas até uma concentração de NaCl de 2 M. Pode-se concluir que as AuNP-CALNN eram extremamente estáveis em solução, até mesmo em soluções com elevada força iónica.

Após a análise dos resultados de agregação por aumento da força iónica e de forma a se manterem as condições dos ensaios iguais, para efeitos comparativos entre eles, decidiu-se não ultrapassar concentrações de 30 mM de soluções tampão aquando da utilização de nanopartículas.

3.1.3 Ensaios de agregação de nanopartículas de ouro com a variação do pH

A estabilidade da solução de nanopartículas, além de depender do seu agente de revestimento, força iónica, depende ainda do pH do meio. De forma a verificar em que valores de pH as solução de nanopartículas são estáveis, fizeram-se ensaios de agregação variando o pH para as nanopartículas com os três tipos de revestimento (Fig.3.4).



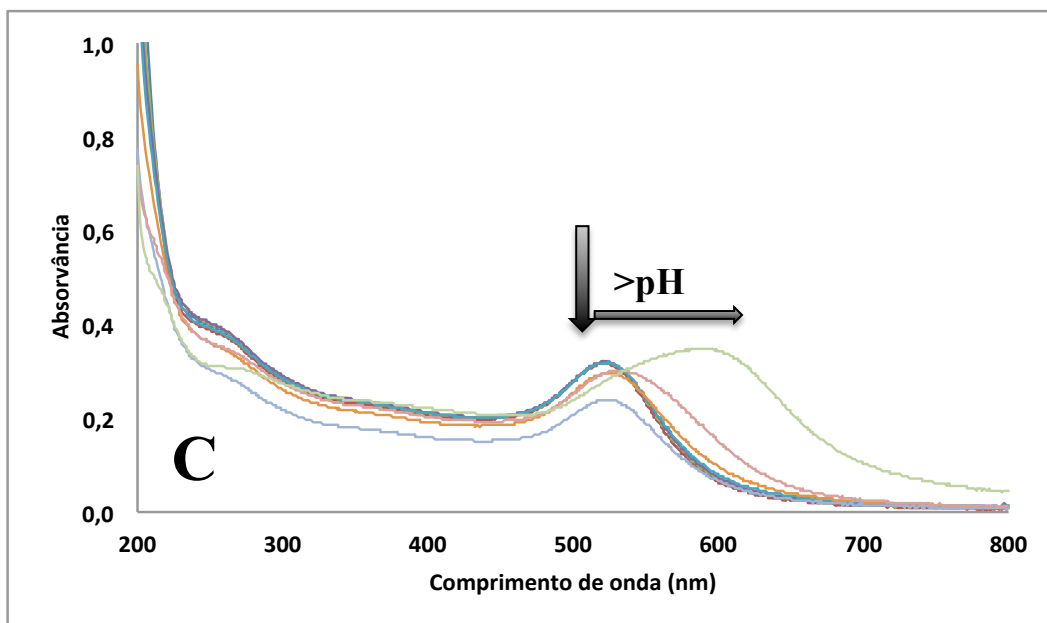
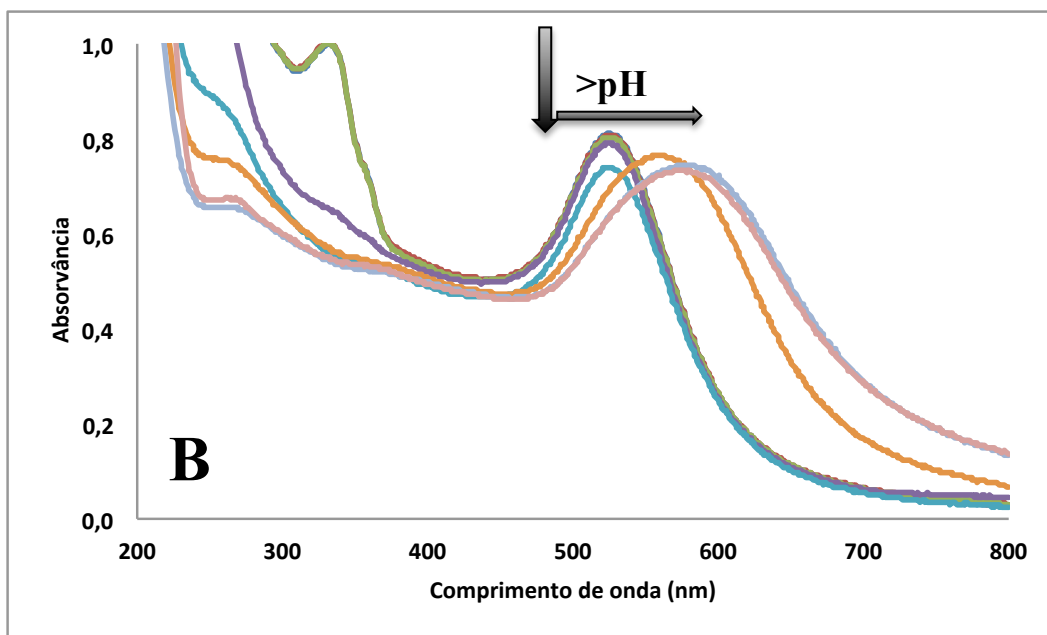
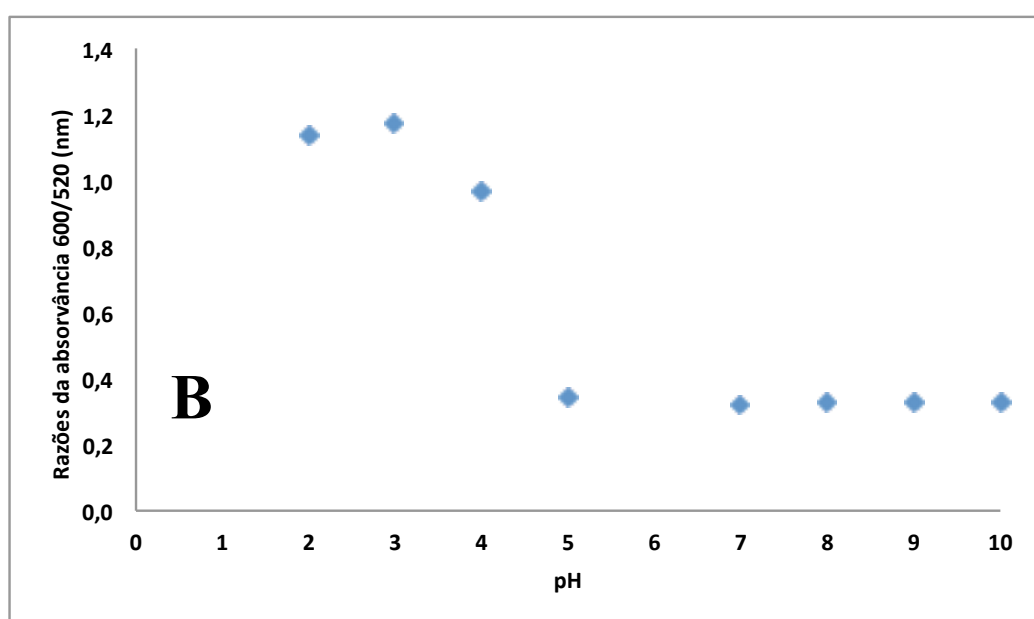
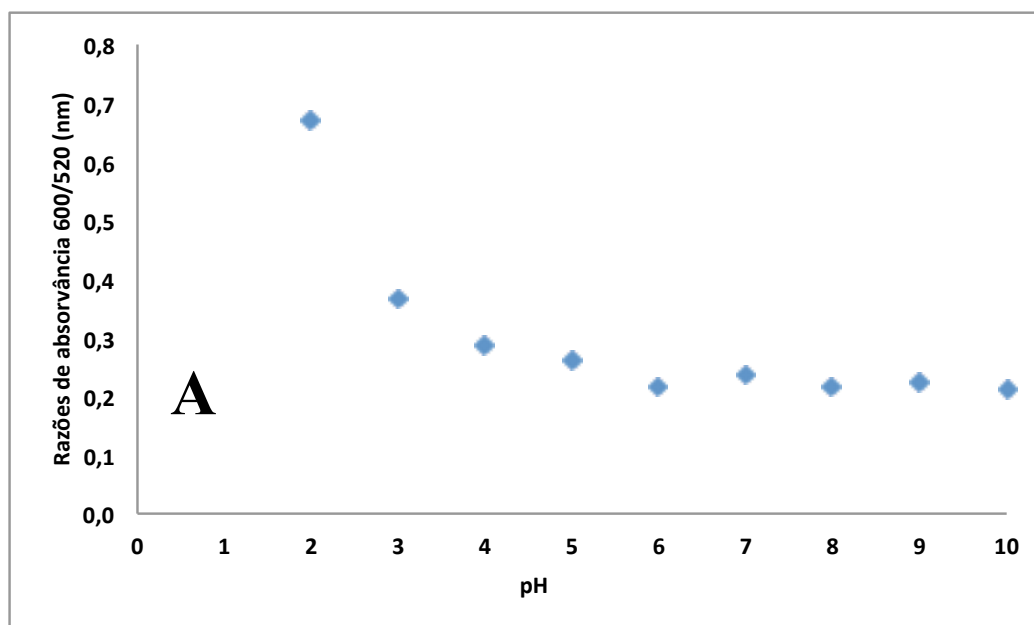


Figura 3.4 – Espectros de UV/visível de AuNP (3 nM), com diferentes agentes de revestimento, com a variação de pH. A – AuNP; B – AuNP-MUA; C AuNP-CALNN

Nos espectros UV/Visível das nanopartículas de ouro da figura 3.4 observaram-se alterações à medida que o pH foi variando, especialmente quando o pH atingiu valores abaixo de 6. As alterações observadas foram a diminuição da banda da plasmónica a 520 nm, o aumento da absorvância a comprimentos de onda maiores e ainda o alargamento da banda da plasmónica, causadas pela precipitação (Figura 3.4-A) e agregação (Figura 3.4-B e C) das nanopartículas. A agregação causada pelo pH deve-se ao facto de se ter atingido o valor de pKa do agente de revestimento (Citrato: 2-3; MUA: 4,4-5,7 e CALNN: 3-4) das nanopartículas de ouro. Assim que o pKa do agente de

revestimento foi atingido, este ficou protonado deixando de conferir às nanopartículas uma carga superficial negativa que era responsável pelas interações de repulsão entre as nanopartículas. Devido à falta das interações negativas entre nanopartículas criou-se um ambiente instável na solução coloidal que levou à agregação das mesmas.

Para se determinar com exactidão o pH, ao qual os agentes de revestimento ficaram protonados e provocaram a agregação das nanopartículas, calcularam-se as razões de agregação para cada tipo de agente de revestimento (Fig.3.5).



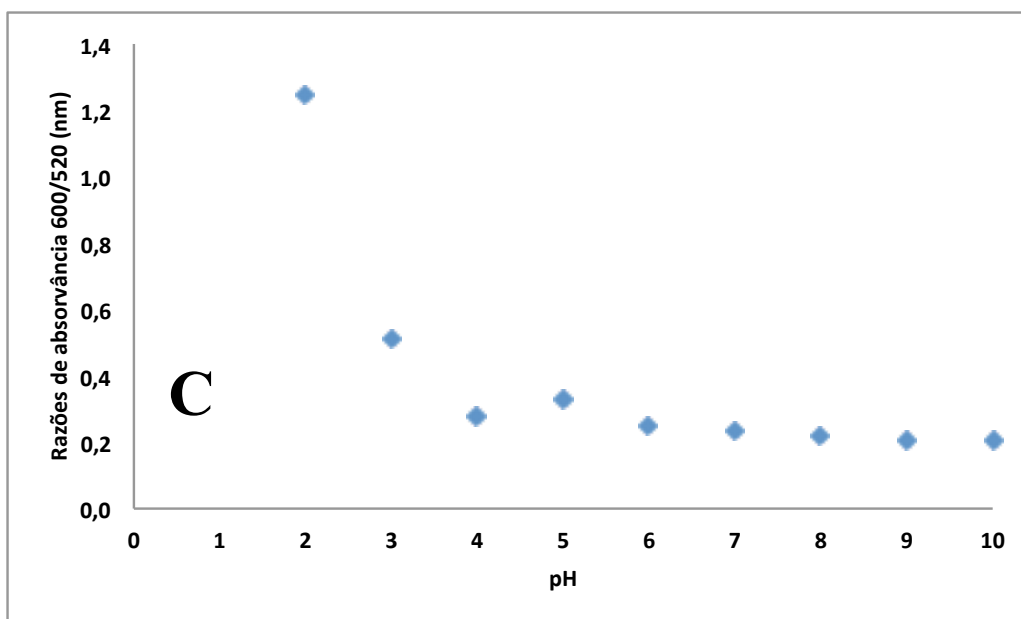


Figura 3.5 – Gráficos das razões de agregação das AuNP com a variação de pH, para vários agentes de revestimento. A- AuNP; B – AuNP-MUA; C – AuNP-CALNN

Analisando os gráficos presentes na figura 3.5 observou-se, para os três tipos de revestimento utilizados, que a valores de pH alcalinos não existiu agregação das nanopartículas de ouro (espécie não agregada predomina sobre a espécie agregada). A predominância, a valores de pH alcalinos, da espécie não agregada deveu-se ao facto de as nanopartículas de ouro possuírem uma carga superficial negativa conferida pelos agentes de revestimento desprotonados que mantiveram a estabilidade da solução coloidal.

À medida que o valor de pH baixa e se atingiram valores ácidos começou-se a observar agregação das nanopartículas, com os três agentes de revestimento. A diferença entre os perfis de agregação das nanopartículas deve-se aos diferentes valores de pKa que cada revestimento tem. No espectro A respeitante às AuNP começa-se a observar precipitação das nanopartículas a valores de pH menores ou iguais a 3, uma vez que o valor de pKa do citrato está entre o pH 2 e o 3. No espectro B que diz respeito às AuNP-MUA observa-se agregação para valores de pH menores que 5, pois o pKa do MUA fica entre 4,4 e 5,7. Por último no espectro C referente às AuNP-CALNN a agregação inicia-se a pH 4 já que o valor de pKa do CALNN está entre o pH 3 e 4.

3.1.4 Determinação da quantidade de proteína presente no *stock* de Tirosinase pelo método do ácido bicinconínico

Antes de se efectuar qualquer tipo de ensaio enzimático foi necessário determinar a quantidade real de proteína presente no *stock* de Tirosinase, esta determinação foi feita através do método de BCA. Inicialmente procedeu-se a construção de uma recta de calibração (Fig.3.6) com concentrações conhecidas de uma proteína padrão, a BSA.

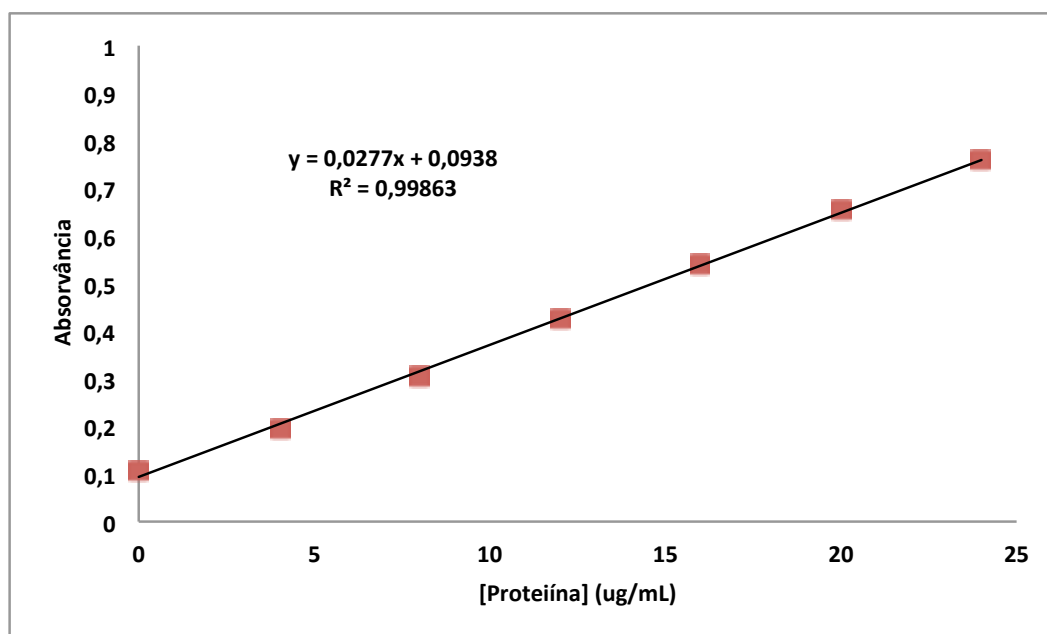


Figura 3.6 – Recta de calibração do método de BCA efectuada com concentrações conhecidas de BSA: 0, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 µg/mL.

Com a equação da recta de calibração – $y = 0,0277x + 0,0938$, com a média da absorvância de três amostras do *stock* de Tirosinase – 0,643 e tendo em conta o factor de diluição das amostras – 1:30 efectuou-se o cálculo da concentração de proteína existente no *stock*. A concentração de proteína presente no *stock* de Tirosinase é de 661 µg/mL.

O valor da concentração real de proteína existente no *stock* de Tirosinase foi tido em conta nos cálculos de todas as soluções preparadas com Tirosinase durante todo o trabalho.

3.1.5 Verificação da pureza por SDS-PAGE e actividade por PAGE do *stock* de Tirosinase

Pelo resultado do método de BCA verificou-se que por cada 1 mg *stock* de Tirosinase apenas cerca de 60% (661 µg) era proteína, sendo a restante massa constituída por impureza não proteicas. Dos 661 µg de proteína existentes foi necessário verificar se eram apenas Tirosinase ou se existiam

outras proteínas misturadas, para tal fez-se o gel de SDS-PAGE (Fig.3.7). Caso toda a proteína fosse apenas Tirosinase era espectável apenas se observar uma banda a 45 kDa que é o peso molecular característico das subunidades H e outra banda a 14 kDa que corresponde às subunidades L da Tirosinase.⁵¹

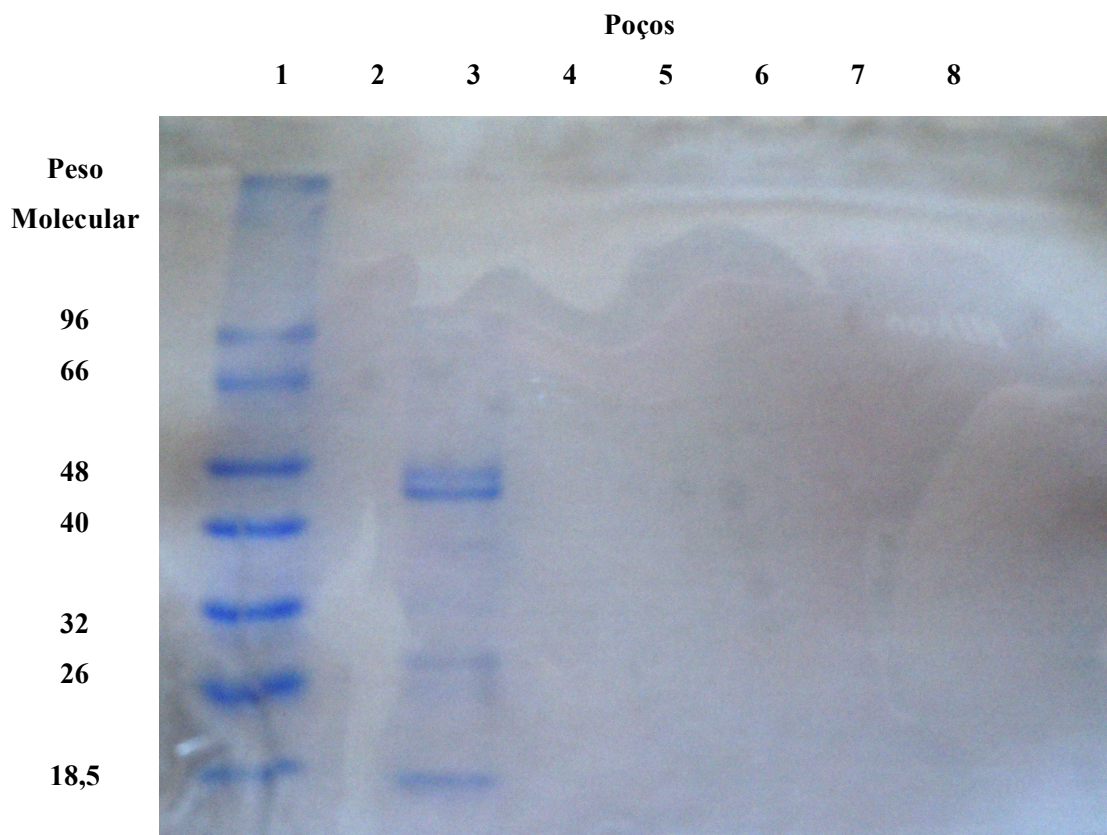


Figura 3.7 – Gel de SDS-PAGE de uma amostra do *stock* de Tirosinase. Poço 1 – Padrões Moleculares; Poço 3 – Amostra do *stock* de Tirosinase.

Pela análise do gel de SDS-PAGE observa-se, no poço 3 onde foi colocada a amostra, as bandas espectáveis da Tirosinase, 45 e 14 kDa, contudo observam-se mais bandas no gel indicando que existem outros componentes proteicos no stock de Tirosinase de origem comercial. Os resultados do gel de SDS-PAGE juntamente com os resultados do BCA levam à conclusão que a Tirosinase adquirida vem com algumas impurezas, impurezas estas que incluem outras proteínas, e que estas impurezas poderiam afectar de diversas formas os ensaios seguintes, quer de actividade quer na construção do biossensor.

Com vista a uma caracterização mais completa do stock de Tirosinase comercial, efectuou-se também um gel PAGE nativo. Neste tipo de gel as proteínas não são desnaturadas pelo SDS por isso permanecem activas. Após o gel ter corrido foi cortado ao meio, uma metade foi colocada em corante azul de Coomassie durante 30 minutos e passado esse tempo foi lavada e colocada numa solução de descoloração durante a noite. A outra metade foi colocada numa solução de de L-Tirosina 1 mM

(substrato natural da Tirosinase) durante a noite e caso a Tirosinase estivesse presente no gel e activa iria metabolizar a L-Tirosina e formar um composto corado. No dia seguinte os géis foram comparados de forma a verificar se a banda corada com Coomassie num dos géis era a mesma banda corada pelo produto da metabolização da L-Tirosina (Fig.3.8).

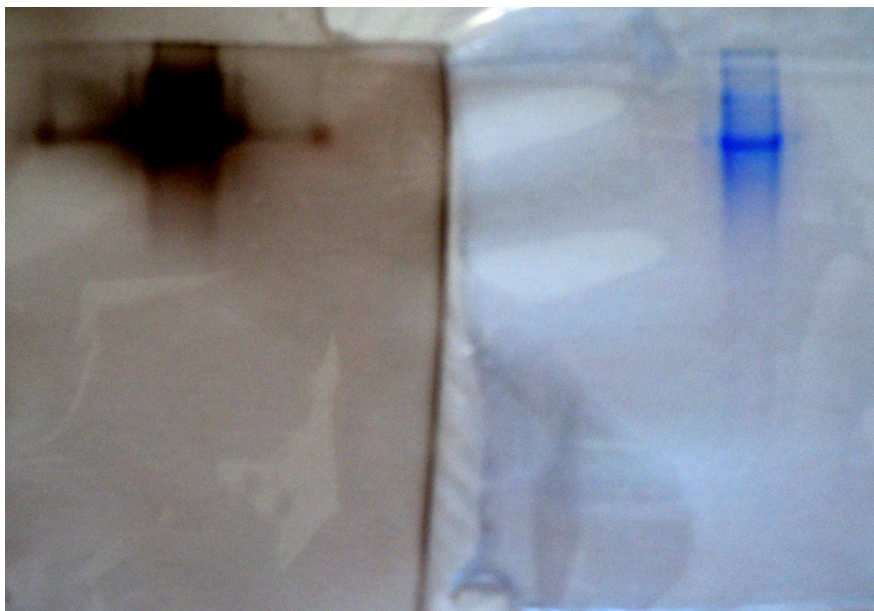


Figura 3.8 – Comparação das duas metades do gel de PAGE, uma colocada em solução de L-Tirosina 1 mM (gel da esquerda) e outra colocada a corar em azul Coomassie (gel da direita).

Analisando as duas metades do gel, vê-se claramente que a banda do gel que ficou corada com o produto da metabolização da L-Tirosina está na mesma posição que a banda corada por Coomassie na outra metade do gel, apesar de a banda corada com o produto da metabolização da L-Tirosina apresentar algum espalhamento devido à reacção excessiva da Tirosinase com a L-Tirosina. Os resultados obtidos com este ensaio não só corroboram os resultados do gel de SDS-PAGE da existência de Tirosinase no *stock*, como também permitem concluir que a Tirosinase presente é activa.

3.2 Determinação da actividade da Tirosinase livre e de bionanoconjugados de Tirosinase, com diferentes agentes de revestimento, na gama de pH 4-8

Sabendo que a actividade das enzimas é fortemente dependente do pH, assim como a estabilidade das nanopartículas de ouro, decidiu-se testar a actividade da Tirosinase livre e em bionanoconjugados com nanopartículas revestidas por três revestimentos diferentes (Citrato, MUA e CALNN) num gama de pH de 4 a 8. Pretendeu-se verificar se o facto da Tirosinase estar imobilizada com as nanopartículas provocava algum melhoramento na sua actividade ou se por estar ligada às nanopartículas exibe

actividade em valores de pH que na forma livre não exhibiria. Os ensaios foram feitos a força iónica constante e utilizou-se como substrato da Tirosinase a L-Tirosina, a absorvância foi lida ao longo do tempo (10 minutos de ensaio) a um comprimento de onda de 280 nm. Os ensaios de cada valor de pH foram repetidos três vezes, foi feita a média dos três resultados e foi utilizado esse valor, juntamente com o desvio padrão, para fazer um tratamento gráfico dos resultados obtidos (Fig.3.9). O tratamento dos resultados foi feito com base num formulário disponível nos protocolos de determinação de actividade específicos para este tipo de proteínas disponibilizado pela Sigma-Aldrich (Apêndice I).

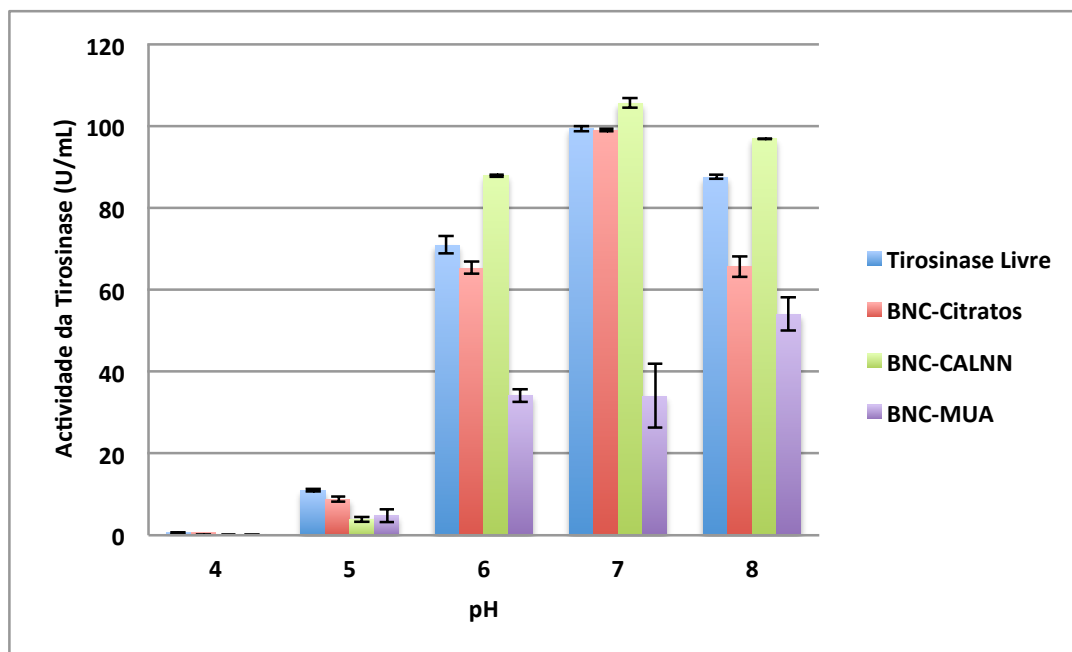


Figura 3.9 – Actividade da Tirosinase livre e de bionanoconjugados de Tirosinase com os três tipos de agentes revestimento diferentes. A actividade é expressa em Unidade/mL de enzima (U/mL).

Analisando o gráfico, observou-se que a pH 4 e 5 a actividade quer da Tirosinase livre quer dos bionanoconjugados de Tirosinase foi quase nula, se bem que a pH 5 foi um pouco mais elevada que a pH 4. Esta perda de actividade deve-se ao facto de que a valores de pH baixos a Tirosinase ficar desnaturada e perder assim qualquer capacidade catalítica.⁷⁵

Com os dados obtidos para valores de pH 6, 7 e 8 observou-se que os bionanoconjugados com CALNN são os que apresentaram maior actividade, comparativamente à enzima livre e os restantes bionanoconjugados, tornando-se assim no melhor dos três tipos de revestimento estudados.

A ligação da Tirosinase as AuNP não é muito favorecida uma vez que a ligação entre o citrato e a nanopartículas é apenas electrostática e como é um ligando pequeno a Tirosinase ao se ligar vai ficar muito perto do superfície da nanopartícula, um ambiente com demasiada densidade electrónica e por isso pouco favorável a interacção com proteínas.

O MUA é um revestimento que faz uma ligação entre o seu tiol e os átomos de ouro da nanopartícula (RS-Au), este tipo de ligação é quase tão forte como a ligação ouro-ouro o que faz com que seja muito estável.⁷⁶ Além da ligação estável criada entre o MUA e as nanopartículas de ouro, o MUA é uma molécula maior que o citrato o que faz com que a Tirosinase ao ligar-se não interactue tão proximamente com o núcleo das nanopartículas. Observou-se experimentalmente, figura 3.9, que os bionanoconjugados de Tirosinase com AuNP-MUA possuíam menos actividade comparativamente à Tirosinase livre e aos bionanoconjugados de Tirosinase com AuNP. A principal causa apontada seria a existência de MUA em excesso em solução que poderá ter reagido com o produto da Tirosinase levando à formação um produto incolor (mecanismo reacção ainda por caracterizar).^{75a} Desta forma a utilização do MUA, como revestimento de nanopartículas, torna-se pouco eficaz para formar bionanoconjugados com a Tirosinase para determinação da actividade a não ser que se possa garantir que não existe nenhum MUA em solução que possa reagir com o produto da Tirosinase.

Sabendo que o CALNN assim como o MUA se liga covalentemente às nanopartículas criando estabilidade para a ligação da Tirosinase, no entanto o CALNN torna-se num melhor agente de revestimento para a formação de bionanoconjugados do que o MUA porque o CALNN sendo um péptido consegue mimetizar interacções proteína-proteína promovendo a ligação da Tirosinase.

De seguida calculou-se a percentagem da actividade bionanoconjugados face à actividade da Tirosinase livre (Fig.3.10), de forma a se poder concluir quanto à vantagem de se utilizar bionanoconjugados invés de enzima livre e, caso tal se verifica-se, qual dos bionanoconjugados possui mais vantagens em ser utilizado.

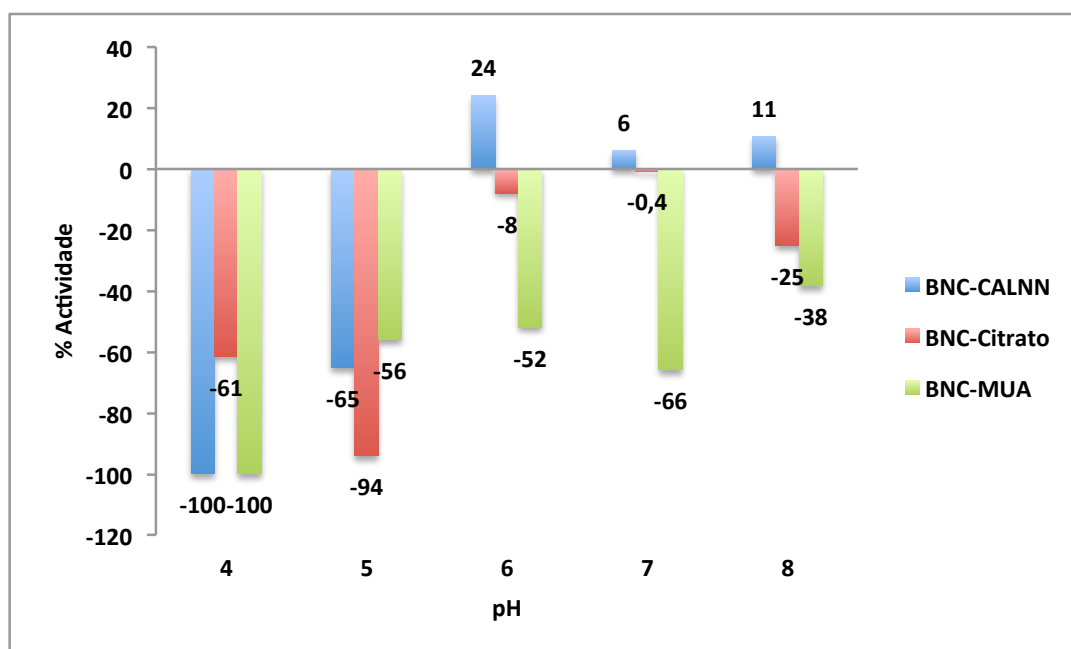


Figura 3.10 – Actividade dos bionanoconjugados de Tirosinase face à actividade da Tirosinase livre, em valor percentual.

Ao se analisar o gráfico da figura 3.10, verificou-se que os bionanoconjugados, nos quais foram utilizados o citrato e o MUA como agentes de revestimento, não se verificaram quais vantagens na sua utilização, até pelo contrário, os bionanoconjugados com MUA e citrato prejudicaram a actividade da Tirosinase em todas as condições testadas, em especial a pH 4 e 5. O CALNN foi o único agente de revestimento que em três das cinco condições testadas, nomeadamente a pH 6, 7 e 8, trouxe alguma vantagem para a actividade catalítica da Tirosinase em bionanoconjugado face à enzima livre. A pH 6 observou um aumento da actividade da Tirosinase em bionanoconjugado, em 26%, face à Tirosinase livre, seguido pelo ensaio a pH 8 (11% de aumento na actividade) e por último a pH 7 (6% de aumento na actividade).

3.3 Desenvolvimento do biossensor

3.3.1 Electrodeposição do ouro sobre o eléctrodo de FTO

Na figura 3.11 pode-se observar um voltamograma cíclico relativo à electrodeposição do ouro sobre a superfície do eléctrodo de FTO.

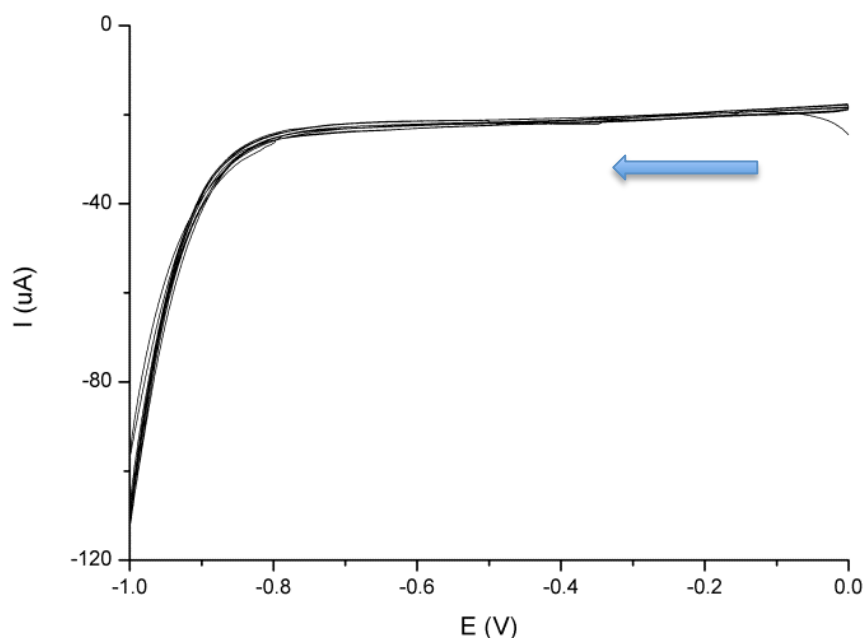


Figura 3.11 – Electrodeposição do ouro por voltametria cíclica a uma velocidade de varrimento de 0,010 V/s durante 5 ciclos de deposição.

No voltamograma da figura 3.11 pode observar-se ao aumento de corrente Faradaica a partir dos -0,8 V de potencial atingindo um máximo de corrente a -1 V, onde é interrompida. A utilização de potenciais redox que rondam o valor de -1 V em sistemas com soluções aquosas podem ser problemáticos porque nesta gama de potencial existem vários compostos, como o oxigénio, dissolvido em solução, ou a formação de hidrogénio através da hidrólise da água que podem trazer problemas à deposição do ouro no eléctrodo. Outra razão para não se utilizar potenciais inferiores a -1 V é que o potencial redox do ouro, de Au^{3+} para Au^0 , fica entre os -0,8 V e o -1 V, como tal não existe a necessidade de se gastar mais energia para diminuir o potencial para valores sem utilidade para o processo de deposição do ouro. No desenvolvimento deste biossensor ficou em falta um ensaio de controlo da electrodeposição do ouro – ensaio nas mesmas condições da electrodeposição do ouro, mas sem este último de forma a verificar se existia electrólise da água ao mesmo tempo que o ouro era electrodepositado ou se o sinal que se obteve foi apenas da electrodeposição do ouro.

3.3.2 Verificação do sucesso da electrodeposição do ouro através de ensaios de voltametria cíclica com o ferricianeto de potássio

O sucesso da deposição do ouro sobre o eléctrodo de FTO é comprovada através da melhoria da condução eléctrica juntamente com a diminuição da resistência à passagem de corrente. Existem várias técnicas que podem ser utilizadas para realizar esta confirmação, entre as quais a verificação do aumento da reversibilidade de uma reacção electroquímica padrão (com o Ferricianeto de potássio) do eléctrodo não depositado (Fig.3.12) quando comparado com o eléctrodo com o ouro depositado (Fig.3.13).^{46a}

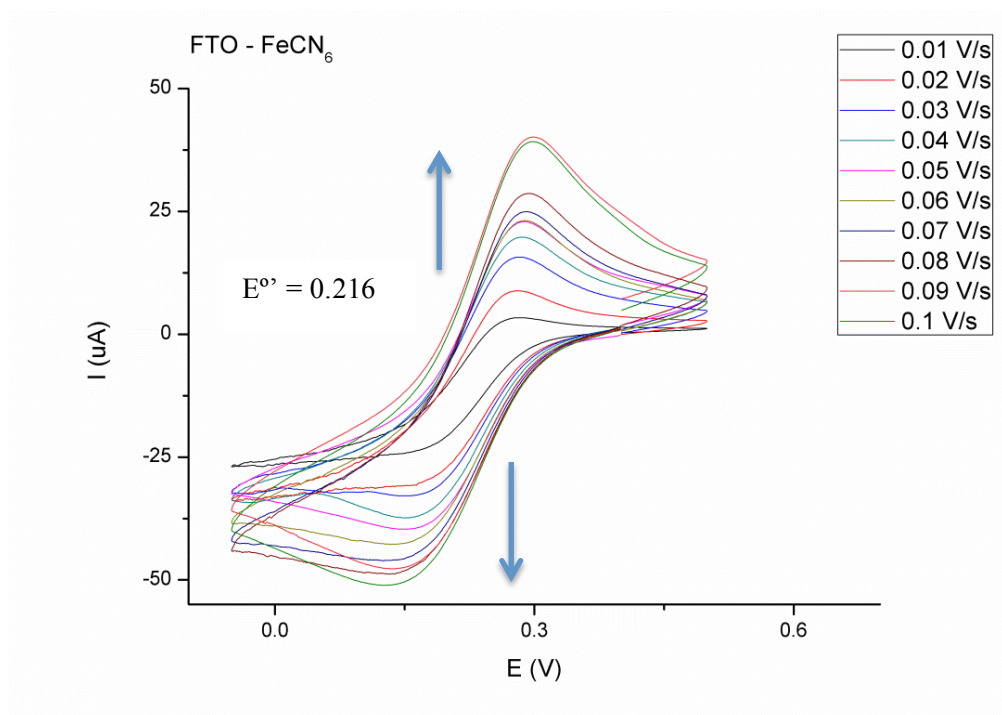


Figura 3.12 – Ensaio de voltametria cíclica do ferricianeto de potássio a 1 mM, a várias velocidades de varrimento, no eléctrodo de FTO.

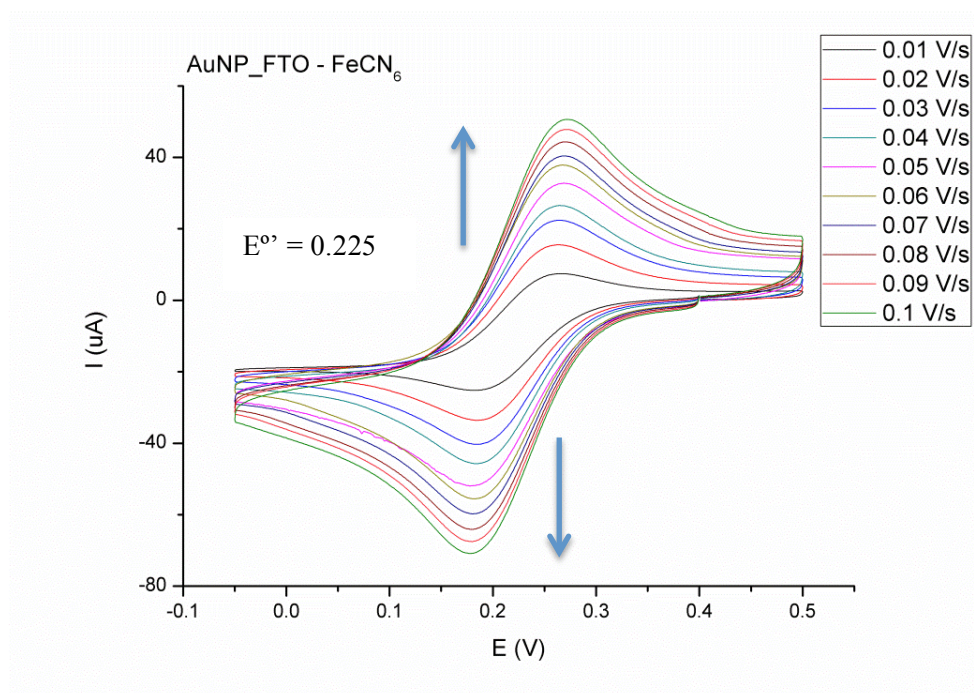


Figura 3.13 - Ensaio de voltametria cíclica com ferricianeto de potássio a 1 mM, a várias velocidades de varrimento, no eléctrodo de AuNP-FTO.

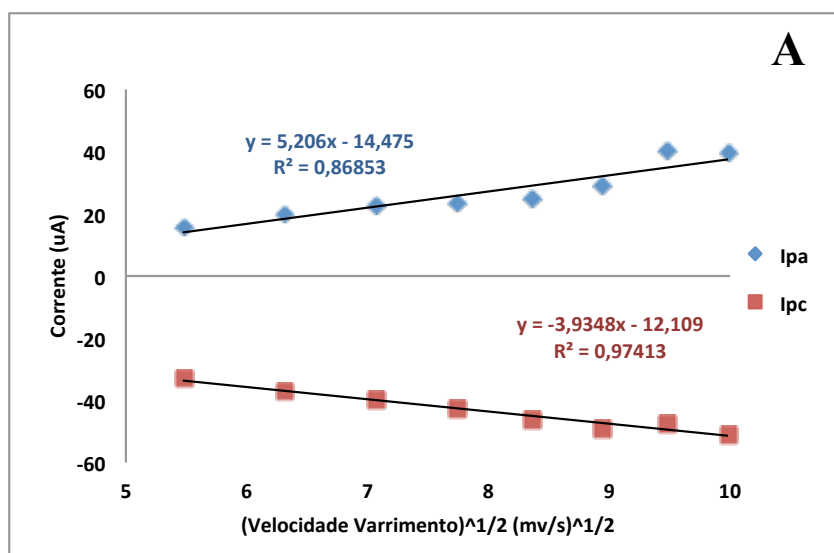
Ao se analisar os voltamogramas anteriores observou-se um aumento da reversibilidade do sistema do eléctrodo AuNP-FTO, comparativamente ao eléctrodo FTO. As curvas dos voltamogramas ficaram mais bem definidas, o valor do potencial formal (E°) passou de 0,216 para 0,225 V que é um valor característico em voltamogramas do ferricianeto de potássio. O aumento de reversibilidade foi ainda comprovado pelo cálculo do parâmetro de reversibilidade do sistema que é a diferença entre o potencial catódico e o potencial anódico (Equação 1.1). Os resultados são apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Tabela com os valores calculados, da diferença entre o potencial catódico e o anódico, para os eléctrodos FTO e AuNP-FTO.

Eléctrodo	$\Delta(E_{pa} - E_{pc})$ (V)	
	Média	Desvio Padrão
FTO	0,152	0,015
AuNP-FTO	0,087	0,005

Segundo a equação 1.1, a diferença entre o potencial catódico e o anódico tem de ser igual a um determinado valor de potencial (0,059 V) a dividir pelo número de electrões no processo. Na redução do ferricianeto de potássio existe a passagem de Fe(III) para Fe(II), ou seja, está apenas um electrão envolvido no processo. Logo pela equação 1, idealmente, a diferença entre o potencial catódico e o anódico deveria ser 0,059 V. Na tabela 3.1 o valor desta diferença de potencial para o eléctrodo de FTO foi de 0,152 V e para o eléctrodo AuNP-FTO foi de 0,087 V, o valor do eléctrodo AuNP-FTO está muito mais próximo do valor ideal do que o valor do eléctrodo FTO confirmando mais uma vez o sucesso da electrodeposição do ouro pelo aumento da reversibilidade do sistema numa reacção electroquímica padrão.

Com vista a confirmar o aumento da reversibilidade do sistema após electrodeposição do ouro, traçaram-se dois gráficos, para cada um dos eléctrodos – FTO (Fig.3.14-a)) e AuNP-FTO (Fig.3.14b)), das correntes catódica (I_{pc}) e anódica (I_{pa}) em função da raiz quadrada da velocidade de varrimento ($(\text{mV/s})^{1/2}$).



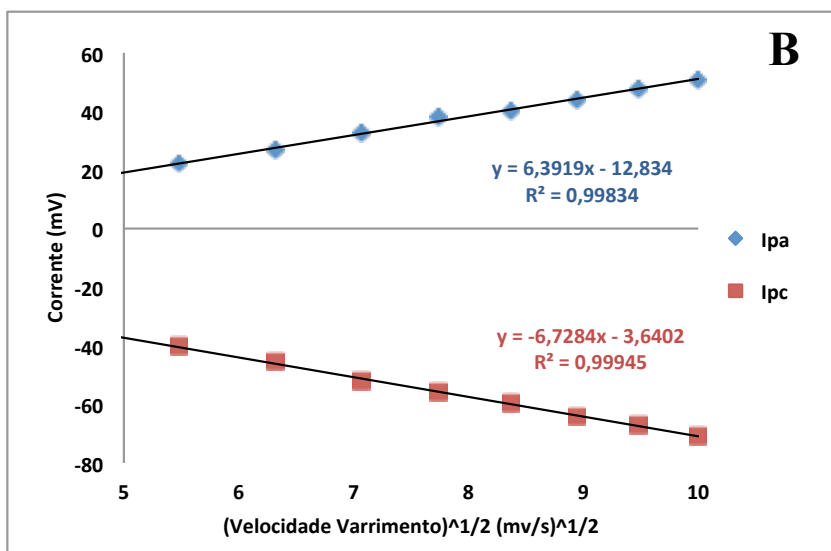


Figura 3.14 – Gráficos das correntes catódica (I_{pc}) e anódica (I_{pa}) vs a velocidade de varrimento ($(\text{mV/s})^{1/2}$). A) Gráfico respeitante ao eléctrodo de FTO; B) Gráfico respeitante ao eléctrodo de AuNP-FTO.

Após se terem traçado as rectas de regressão linear de cada corrente para os gráficos dos dois eléctrodos foram analisados os declives. Numa reacção reversível ideal, a razão entre a corrente dos picos (catódico e anódico) e a raiz quadrada da velocidade de varrimento deve-se manter igual com o aumento da velocidade de varrimento, ou seja, o declive da regressão linear dos dados do pico catódico tem de ser igual, mas de valor simétrico ao valor do declive da regressão linear dos dados do pico anódico.

No que diz respeito ao eléctrodo de FTO o declive da regressão linear dos picos anódico e catódico são 5,206 e -3,934, respectivamente. Uma vez que os valores dos declives das regressões lineares não são iguais, podendo-se afirmar que a reacção do ferricianeto de potássio nos eléctrodo de FTO não é muito reversível.

No eléctrodo de AuNP-FTO o declive da regressão linear dos picos anódico e catódico são 6,391 e -6,728, respectivamente. Estes valores são muito semelhantes e com sinais opostos, podendo-se afirmar que a reacção do ferricianeto de potássio nos eléctrodo de AuNP-FTO é muito reversível, especialmente, quando comparado com o eléctrodo de FTO.

3.3.3 Verificação do sucesso da ligação da Tirosinase ao eléctrodo através de ensaios de voltametria cíclica com o ferricianeto de potássio

O sucesso da ligação da Tirosinase, por *cross-linking*, ao eléctrodo AuNP-FTO foi comprovado utilizando os mesmo ensaios já utilizados para comprovar o sucesso da electrodeposição

do ouro sobre o eléctrodo de FTO. Inicialmente fizeram-se ensaios de voltametria cíclica utilizando a reacção electroquímica padrão do ferricianeto de potássio (Fig.3.15).

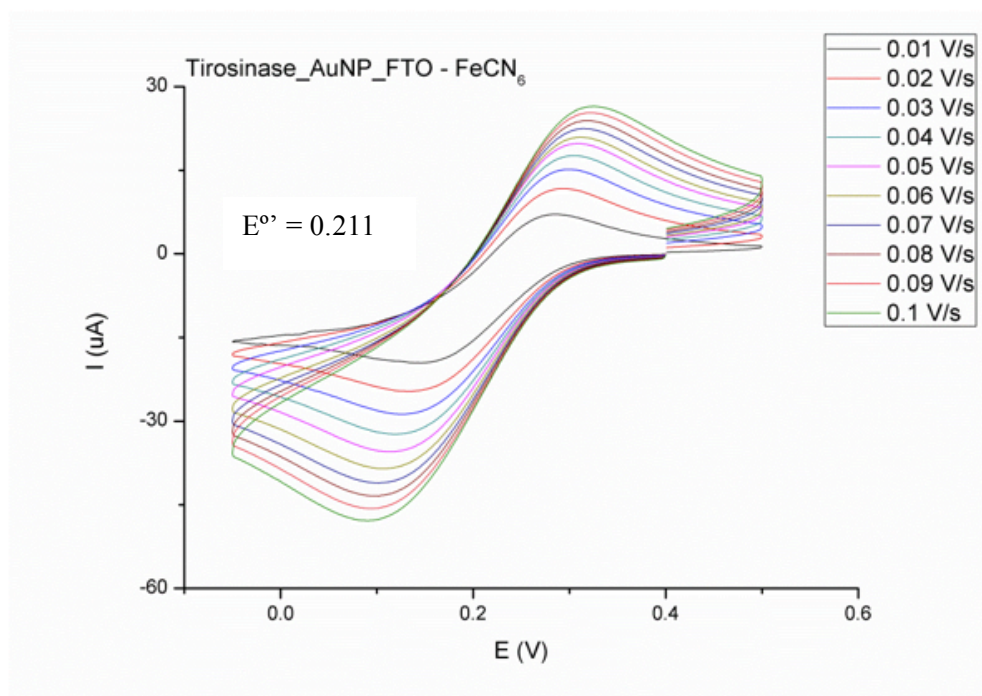


Figura 3.15 - Ensaios de voltametria cíclica com ferricianeto de potássio a 1 mM, a várias velocidades de varrimento, no eléctrodo de Tirosinase-AuNP-FTO.

Ao se analisar os voltamogramas da figura 3,15 observou-se uma diminuição da reversibilidade do sistema do eléctrodo Tirosinase-AuNP-FTO, comparativamente ao eléctrodo AuNP-FTO. As curvas dos voltamogramas ficaram menos definidas, o valor do potencial formal ($E^{\circ'}$) passou de 0,225 V (valor característico para o ferricianeto de potássio, obtido para AuNP-FTO sem tirosinase; Fig. 3.13) para 0,211 V, o que indica perda de reversibilidade do sistema. Calculou-se novamente o parâmetro de reversibilidade do sistema que é a diferença entre o potencial catódico e o potencial anódico (Equação 1) para efetuar a comparação com o eléctrodo de AuNP-FTO (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Tabela com os valores calculados, da diferença entre o potencial catódico e o anódico, para o eléctrodo Tirosinase-AuNP-FTO.

Eléctrodo	$\Delta(E_{pa} - E_{pc})$ (V)	
	Média	Desvio Padrão
AuNP-FTO	0,087	0,059
Tirosinase-AuNP-FTO	0,196	0,031

O valor da diferença de potencial entre os picos catódico e anódico para o eléctrodo de Tirosinase-AuNP-FTO é de 0,196 V, valor muito distante do obtido para o eléctrodo AuNP-FTO (0,087 V) e do ideal (0,059 V).

Repetiu-se o tratamento de dados, já efectuado para os eléctrodos FTO e AuNP-FTO, para o eléctrodo Tirosinase-AuNP-FTO (Fig.3.16) e fez-se o gráfico das correntes catódica (I_{pc}) e anódica (I_{pa}) vs a raiz quadrada da velocidade de varrimento ($(\text{mV/s})^{1/2}$).

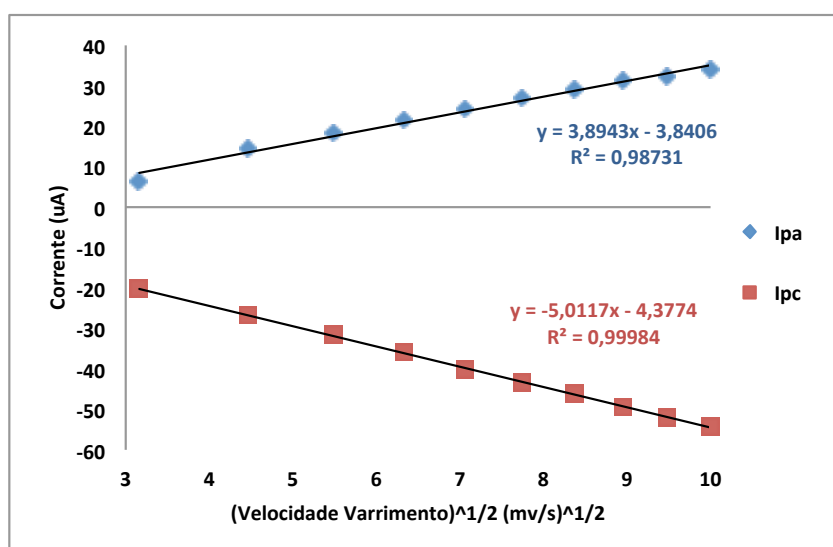


Figura 3.16 - Gráficos das correntes catódica (I_{pc}) e anódica (I_{pa}) vs a velocidade de varrimento ($(\text{mV/s})^{1/2}$) para o eléctrodo Tirosinase-AuNP-FTO.

O declive das rectas de regressão linear obtido para os picos anódico e catódico são 3,894 e - 5,011, respectivamente. Os valores dos declives das regressões lineares dos dois picos, catódico e anódico, são bastante diferentes indicando que a reacção do ferricianeto de potássio no eléctrodo perdeu reversibilidade, especialmente, quando comparado com o eléctrodo de AuNP-FTO.

A comparação entre os resultados obtidos para o eléctrodo AuNP-FTO sozinho, ou com Tirosinase ligada a si, permite observar uma diminuição do potencial formal, um aumento da diferença entre os potenciais anódico e catódico, assim como diferenças entre os valores dos declives das

regressões lineares dos picos das correntes anódica e catódica. Assim, pode concluir-se que os eléctrodos AuNP-FTO perderam reversibilidade após estarem em contacto com a solução de Tirosinase. A perda de reversibilidade do sistema pode dever-se à ligação de um composto orgânico aos eléctrodos AuNP-FTO, dificultando a passagem da corrente eléctrica pelo eléctrodo. Os resultados obtidos nestas experiências são corroborados pelos resultados reportados por Kim, *et al.*^{6, 46b} para um sistema electroquímico semelhante (ver Introdução Teórica), o que suporta adicionalmente a presença de Tirosinase ligada ao eléctrodo.

3.3.4 Caracterização de diferentes fases do desenvolvimento do biossensor por Espectroscopia Electrónica de Varrimento e Espectroscopia Fotoelectrónica de raio-X

Durante o desenvolvimento do biossensor efectuaram-se ensaios de espectroscopia electrónica de varrimento (SEM) e de espectroscopia fotoelectrónica de raios-X (XPS) de forma a verificar as mudanças ocorridas na superfície e na composição química do eléctrodo, à medida que esta ia sendo modificada, permitindo tirar conclusões acerca do sucesso ou insucesso da ligação da Tirosinase ao eléctrodo. Desta forma, fizeram-se três ensaios de cada uma das técnicas para três eléctrodos diferentes, o AuNP-FTO, o MPA-AuNP-FTO e finalmente o eléctrodo Tirosinase-AuNP-FTO.

Os ensaios efectuados em SEM dos três eléctrodos em diferentes estados de desenvolvimento encontram-se abaixo (Fig.3.17) (restantes imagens no Apêndice II).

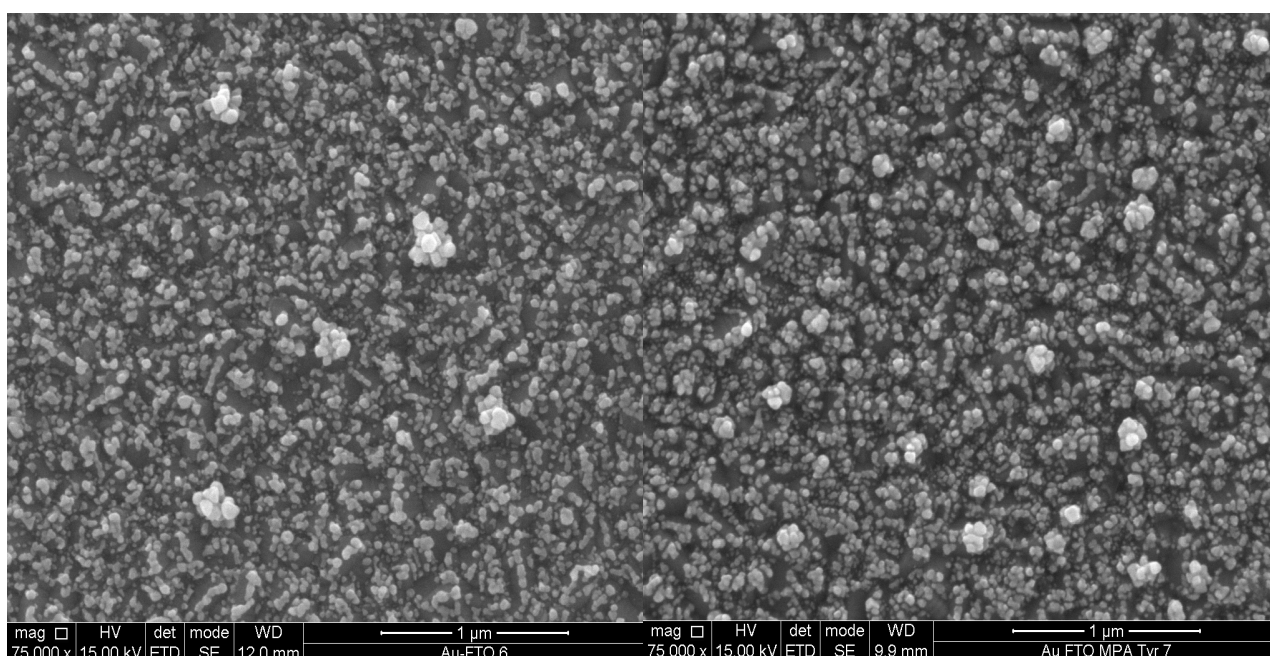
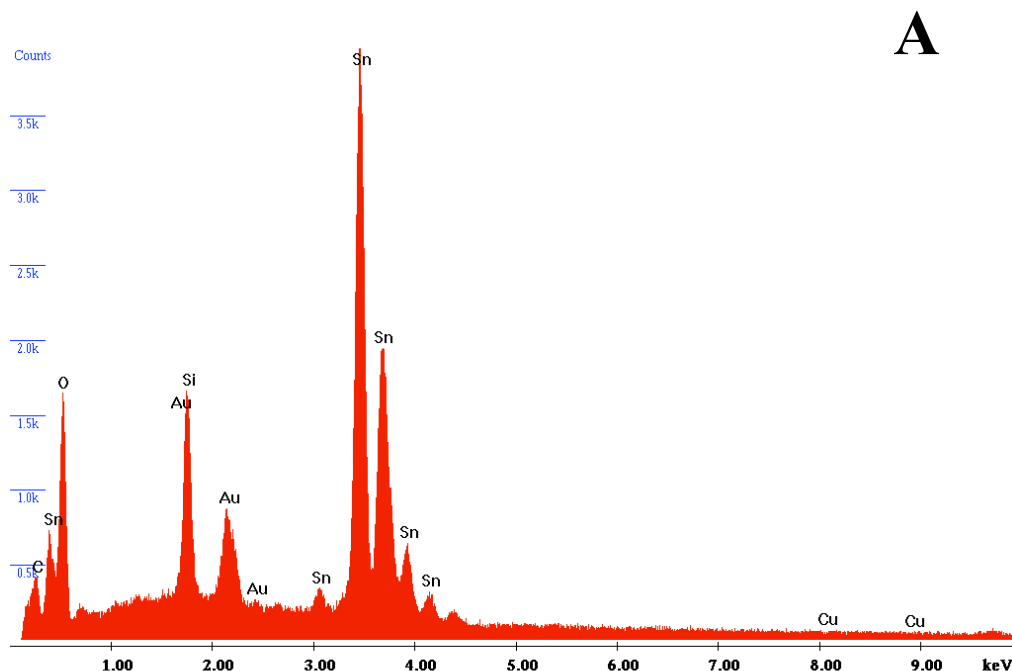


Figura 3.17 – Ensaios de SEM para dois eléctrodos em diferentes estados de desenvolvimento do biossensor. Da esquerda para a direita, o eléctrodo AuNP-FTO e o eléctrodo Tirosinase-AuNP-FTO.

Pela análise dos resultados de SEM do eléctrodo AuNP-FTO, pode-se afirmar que o método de síntese de nanopartículas por electrodeposição sobre a superfície dos eléctrodos de FTO foi bastante eficaz e uniforme, visto que toda a superfície do eléctrodo apresenta a mesma textura de nanopartículas e não se observou zonas do eléctrodo sem nanopartículas. Observou-se ainda pequenos aglomerados de nanopartículas que sobressaem da restante superfície, que contudo parecem fazer parte deste tipo de electrodeposição uma vez que estão presentes em toda a superfície do eléctrodo. Seguidamente testaram-se os eléctrodos MPA-AuNP-FTO e Tirosinase-AuNP-FTO para verificar se a adição de compostos orgânicos à superfície dos eléctrodos tinha afectado a estrutura de nanopartículas existente. Ao serem analisados os resultados, quer do eléctrodo MPA-AuNP-FTO quer do eléctrodo Tirosinase-AuNP-FTO, não se observaram quais alterações à superfície do eléctrodos após a adição do MPA e do EDC/NHS para a ligação da Tirosinase indicando que a adição de compostos orgânicos ao eléctrodo não altera a estrutura das nanopartículas.

Seguidamente fez-se uma análise aos componentes das amostras de SEM - Espectroscopia de Dispersão de Energia para determinar que elementos se encontravam presentes (Fig.3.18).



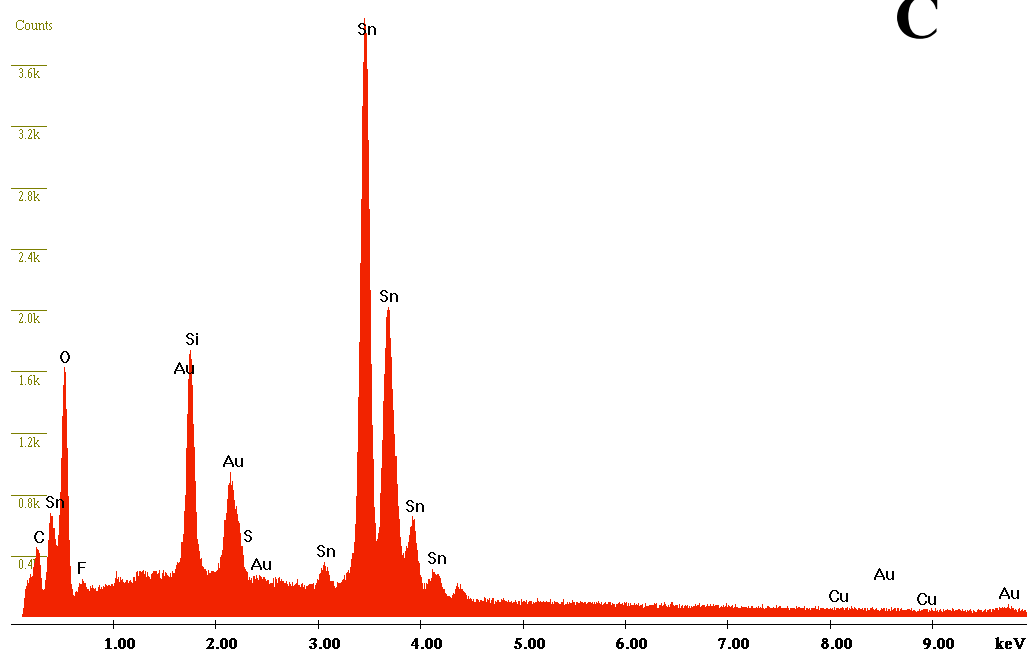
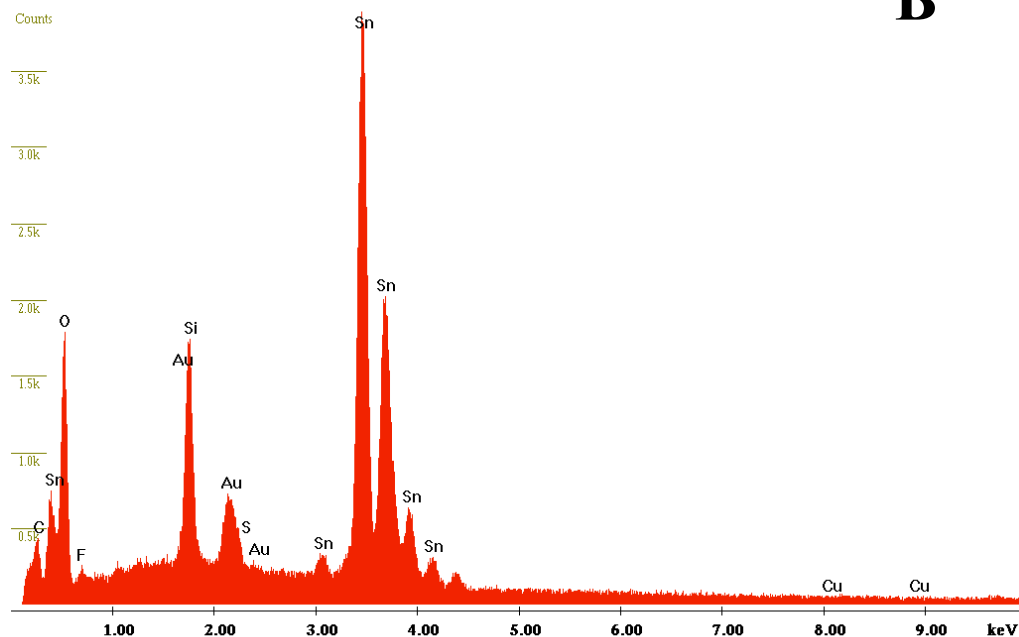


Figura 3.18 – Análise por SEM-EDS dos elementos constituintes dos três eléctrodos analisados. A – AuNP-FTO; B – MPA-AuNP-FTO e C – Tirosinase-AuNP-FTO.

Pelos resultados obtidos da análise dos constituintes dos três eléctrodos, concluiu-se que são constituídos principalmente por estanho (Sn), ouro (Au) e Oxigénio (O). O estanho, o oxigénio e o ouro são os constituintes principais dos eléctrodos, o estanho e o oxigénio são os componentes do óxido de estanho do eléctrodo de FTO e o ouro da camada de nanopartículas electrodepositadas à superfície do FTO. No entanto, não foram detectados quaisquer elementos identificativos da presença

dos compostos orgânicos adicionados aos eléctrodos, nomeadamente o enxofre dos grupos tiol do MPA ligados às nanopartículas e o carbono, o azoto e o cobre que são constituintes da Tirosinase. Tais elementos não foram detectados provavelmente porque as quantidades que ficaram ligadas aos eléctrodos são demasiado pequenas para a sensibilidade das medidas de SEM.

Efectuaram-se ensaios de XPS em eléctrodos iguais aos utilizados no ensaios de SEM, de maneira a se poder confirmar se o MPA e a Tirosinase se tinham ligado os eléctrodos e se os resultados de XPS confirmavam os resultados da análise de elementos do SEM. Houve um problema de contaminação do eléctrodo MPA-AuNP-FTO e desta forma apenas foram analisados os resultados para os eléctrodos AuNP-FTO (Tabela 3.3) e Tirosinase-AuNP-FTO (Tabela 3.4) (restantes dados no Apêndice III).

Tabela 3.3 – Tabela de resultados do XPS para o eléctrodo AuNP-FTO. Anodo – Al monocromático; E° - 15 kV (90 W); Modo da lente – Híbrido; Iris – Ranhura; Neutralizador de carga – Ligado; Correção de carga – 2,6 eV (Ref: C1s 285 eV).

Elemento	Intervalo do pico	Área (cps eV)	Factor de sensibilidade	Contribuição (%)
C 1s	291,91 to 280,74 eV	7562,1	0,278	40,34
N 1s	406,82 to 396,91 eV	524,6	0,477	1,63
O 1s	538,42 to 526,42 eV	14924,6	0,78	28,37
S 2p	173,54 to 158,94 eV	1368,5	0,668	3,04
Cu 2p3	939,76 to 928,93 eV	-----	3,547	ND
Sn 3d5	491,99 to 482,84 eV	22755,2	4,725	7,14
Au 4f5+4f7	92,37 to 79,66 eV	82103,2	6,25	19,48

Tabela 3.4 – Tabela de resultados do XPS para o eléctrodo Tirosinase-AuNP-FTO. Anodo – Al monocromático; E° - 15 kV (90 W); Modo da lente – Híbrido; Iris – Ranhura; Neutralizador de carga – Ligado; Correção de carga – 2,6 eV (Ref: C1s 285 eV).* medição efectuada utilizando o espectro de suavização.

Elemento	Intervalo do pico	Área (cps eV)	Factor de sensibilidade	Contribuição (%)
C 1s	291,16 to 281,10 eV	12317,3	0,278	53,88
N 1s	406,08 to 394,70 eV	1597,6	0,477	4,07
O 1s	535,78 to 526,61 eV	17474,5	0,78	27,24
S 2p	175,07 to 157,97 eV	948,5	0,668	1,73
Cu 2p3	937,87 to 927,59 eV	86,9	3,547	0,03 (*)
Sn 3d5	490,57 to 481,45 eV	28099,0	4,725	7,23
Au 4f5+4f7	91,99 to 79,37 eV	29895,4	6,25	5,82

Os resultados obtidos, por XPS, para o eléctrodo de AuNP-FTO (Tabela 3.3) indicam que a superfície do eléctrodo contém carbono, azoto, oxigénio, enxofre, estanho e ouro. O estanho e o oxigénio detectados nesta amostra correspondem ao óxido de estanho que é o composto principal do vidro que constitui o eléctrodo. O azoto e algum do oxigénio detectados correspondem, provavelmente, à atmosfera presente no aparelho durante o ensaio, uma vez que não se encontra presente, no eléctrodo AuNP-FTO, qualquer composto azotado. Detectou-se ainda carbono e enxofre, elementos que não era suposto serem detectados neste eléctrodo, suspeitando-se de uma possível contaminação com o MPA utilizado para o passo seguinte da construção do biossensor. Independentemente da presença do enxofre e do carbono no eléctrodo AuNP-FTO, a detecção do ouro é uma prova, a acrescentar aos ensaios de voltametria cíclica, em como a electrodeposição do ouro foi bem sucedida.

O eléctrodo Tirosinase-AuNP-FTO foi também analisado por XPS (Tabela 3.4) e os elementos detectados foram o carbono, azoto, oxigénio, enxofre, ouro, estanho e cobre. Efectuou-se a comparação dos resultados dos dois eléctrodos analisados, o eléctrodo AuNP-FTO e o Tirosinase-AuNP-FTO. A contribuição do estanho e do oxigénio não sofreu grandes alterações de um eléctrodo para o outro, o que indicou que a estrutura do eléctrodo não foi afectada pela ligação da Tirosinase ao mesmo. Assumindo que os resultados do eléctrodo AuNP-FTO são de facto os resultados do eléctrodo de MPA-AuNP-FTO, devido à contaminação por MPA, o aumento conjunto da contribuição do carbono e do azoto levou a que se pudesse afirmar que um composto orgânico foi ligado ao eléctrodo Tirosinase-AuNP-FTO. O facto de se ter detectado neste eléctrodo a presença do cobre confirmou que o composto orgânico ligado era a Tirosinase, uma vez que é uma proteína com átomos de cobre no seu centro activo e foi o único composto adicionado ao eléctrodo que poderia conter cobre na sua constituição. Por último detectou-se uma diminuição abrupta nas contribuições do enxofre e do ouro, o

que com os resultados conjuntos do estanho e oxigénio que se mantiveram constantes, permitiu concluir que a Tirosinase ao eléctrodo apenas nas zonas que continham ouro com MPA ligado . A Tirosinase ao se ligar sobre os locais com MPA e nanopartículas fez aumentar a espessura dessa zona e uma vez que o aparelho de XPS analisa sempre a mesma espessura nas amostras, ao analisar uma zona sem Tirosinase e analisar outra com Tirosinase detectou na primeira os elementos do MPA e das nanopartículas e na segunda apenas detectou os elementos constituintes da Tirosinase. Com o aumento de espessura da amostra, pela ligação da Tirosinase, a espessura analisada pelo XPS já não foi a suficiente para detectar os elementos das nanopartículas e do MPA, só os detectou nos locais aonde a Tirosinase não se ligou. Os resultados obtidos permitiram concluir que a ligação da Tirosinase ao eléctrodo, por *cross-linking*, foi efectuada com sucesso e que esta é específica para as zonas do eléctrodo com nanopartículas de ouro e MPA sobre as mesmas.

3.3.5 Ensaios de voltametria cíclica utilizando o catecol como substrato da Tirosinase. Detecção da inibição da Tirosinase pelo catecol.

Inicialmente efectuou-se ensaios de voltametria cíclica com o eléctrodo AuNP-FTO como controlo para excluir qualquer outro composto para além da Tirosinase que pudesse reagir com o catecol e criar falso positivos da presença e actividade da Tirosinase (Fig.3.19). Os ensaios foram feitos em atmosfera normal, em atmosfera saturada de nitrogénio e em atmosfera saturada em oxigénio.

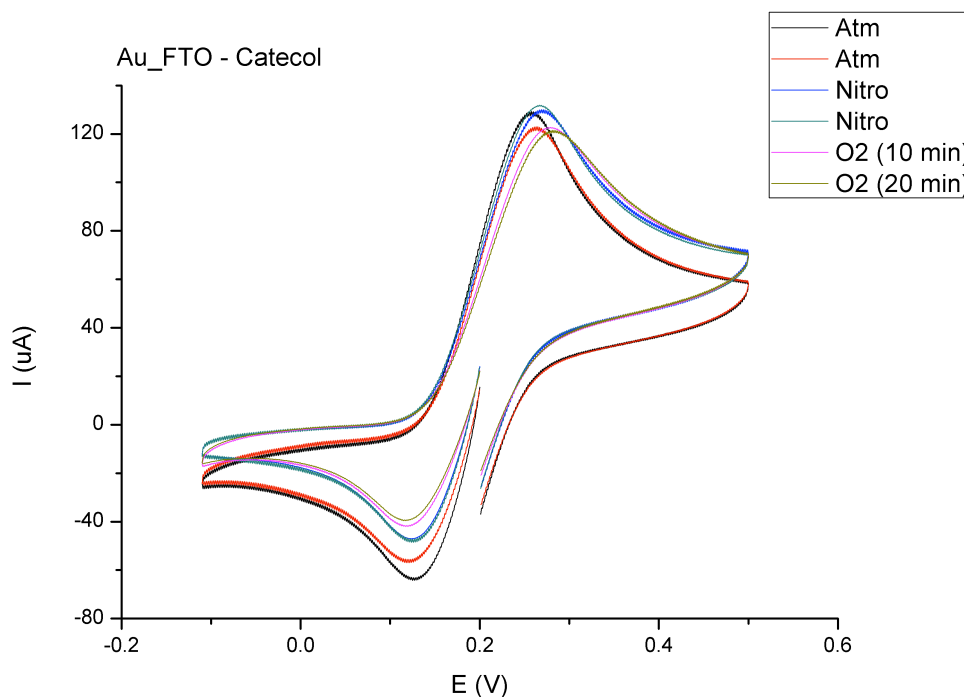


Figura 3.19 - Ensaios de voltametria cíclica com catecol a 1mM, a uma velocidades de varrimento de 0,1 V/s, no eléctrodo de AuNP-FTO. Atm: Ensaios efectuados em atmosfera normal; Nitro: Ensaios efectuados atmosfera saturada em azoto; O2: Ensaios efectuados em atmosfera saturada em oxigénio. Os tempos indicados correspondem ao período de borbulhamento de oxigénio na solução.

Pela análise dos voltamogramas apresentados na figura 3.19 não se observaram alterações significativas na corrente dos picos de redução que pudessem ter indicado que algum composto no eléctrodo AuNP-FTO estivesse a oxidar o catecol para além da oxidação electroquímica, correctamente observada a 0,309 V vs Ag/AgCl(3,5M KCl)⁷⁷. Seguidamente efectuou-se um ensaio nas mesmas condições, mas para o eléctrodo Tirosinase-AuNP-FTO (Fig.3.20) para se verificar se a Tirosinase no eléctrodo estava activa.

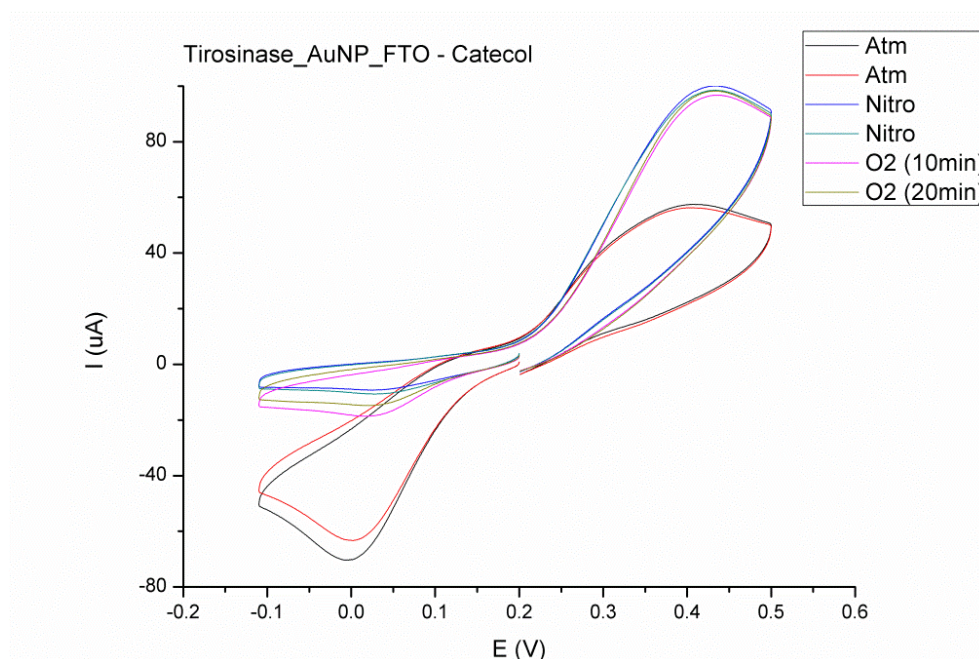


Figura 3.20 - Ensaios de voltametria cíclica com catecol a 1mM, a uma velocidades de varrimento de 0,1 V/s, no eléctrodo de Tirosinase-AuNP-FTO. Atm: Ensaios efectuados em atmosfera normal; Nitro: Ensaios efectuados atmosfera saturada em azoto; O2: Ensaios efectuados em atmosfera saturada em oxigénio. Os tempos indicados correspondem ao período de borbulhamento de oxigénio na solução.

Inicialmente os ensaios de voltametria foram feitos em atmosfera normal, seguida da atmosfera saturada em nitrogénio e por último a atmosfera saturada em oxigénio, apesar de o objetivo final ser apenas a utilização da atmosfera saturada em oxigénio que é a ideal para a Tirosinase, visto que o oxigénio é utilizado por esta enzima como aceitador de electrões provenientes da oxidação de compostos fenólicos.

Os ensaios feitos em atmosfera normal demonstraram que apesar da Tirosinase estar ligada ao eléctrodo de AuNP-FTO observou-se um comportamento oposto ao esperado, pois a corrente do pico catódico diminui invés de aumentar. Mudou-se de atmosfera, para a saturada em nitrogénio, fez-se os voltamogramas e o pico anódico tinha uma corrente elevada uma vez que o sistema estava a oxidar o catecol através do potenciostato e não foi observada qualquer tipo de alteração no pico catódico, o que era espectável uma vez que a Tirosinase só oxida fenóis se tiver oxigénio disponível como aceitador de electrões.

Quando a atmosfera foi saturada em oxigénio, seria espectável que a corrente pico anódico baixasse e a do pico catódico aumentasse pois com excesso de oxigénio em solução a Tirosinase oxidaria o catecol e desta forma o sistema teria de fornecer menos energia para a oxidação deste, e teria que fornecer mais energia para reduzir a quinona (produto da oxidação do catecol) que estaria em maior quantidade do que aquela que o sistema obteve pela oxidação do catecol. Porém não houve qualquer tipo de alteração do voltamograma obtido em atmosfera saturada em nitrogénio relativamente ao voltamograma obtido em atmosfera saturada em oxigénio. Avançou-se então a

hipótese de algum composto da solução ter inibido ou desnaturado a Tirosinase, já que não seria expectável uma enzima ficar inactiva num espaço de minutos a não ser que tivesse estado em contacto com algum inibidor.

A Tirosinase, como já foi referido anteriormente, possui duas vias enzimáticas para oxidar compostos fenólicos consoante estes são mono ou difenóis. Porém estudos já publicados^{75a} demonstraram que a Tirosinase quando possui substrato em excesso torna-se menos selectiva no que diz respeito à via enzimática escolhida e acaba por metabolizar difenóis pela via metabólica dos monofenóis originando o efeito de inibição suicida. A metabolização de difenóis, como o catecol, pela via metabólica dos monofenóis faz com que a Tirosinase adicione um oxigénio à molécula de difenol, desta forma a molécula de difenol fica com par de electrões não partilhado e por ressonância para estabilizar a molécula esse par de electrões vai passar para um dos átomos de cobre do centro activo da Tirosinase que vai ser reduzido de Cu(II) para Cu(0). O Cu(0) deixa de se poder ligar as histidinas do centro activo da Tirosinase o que leva a que esta fique inibida irreversivelmente (Fig.3.21).^{75a}

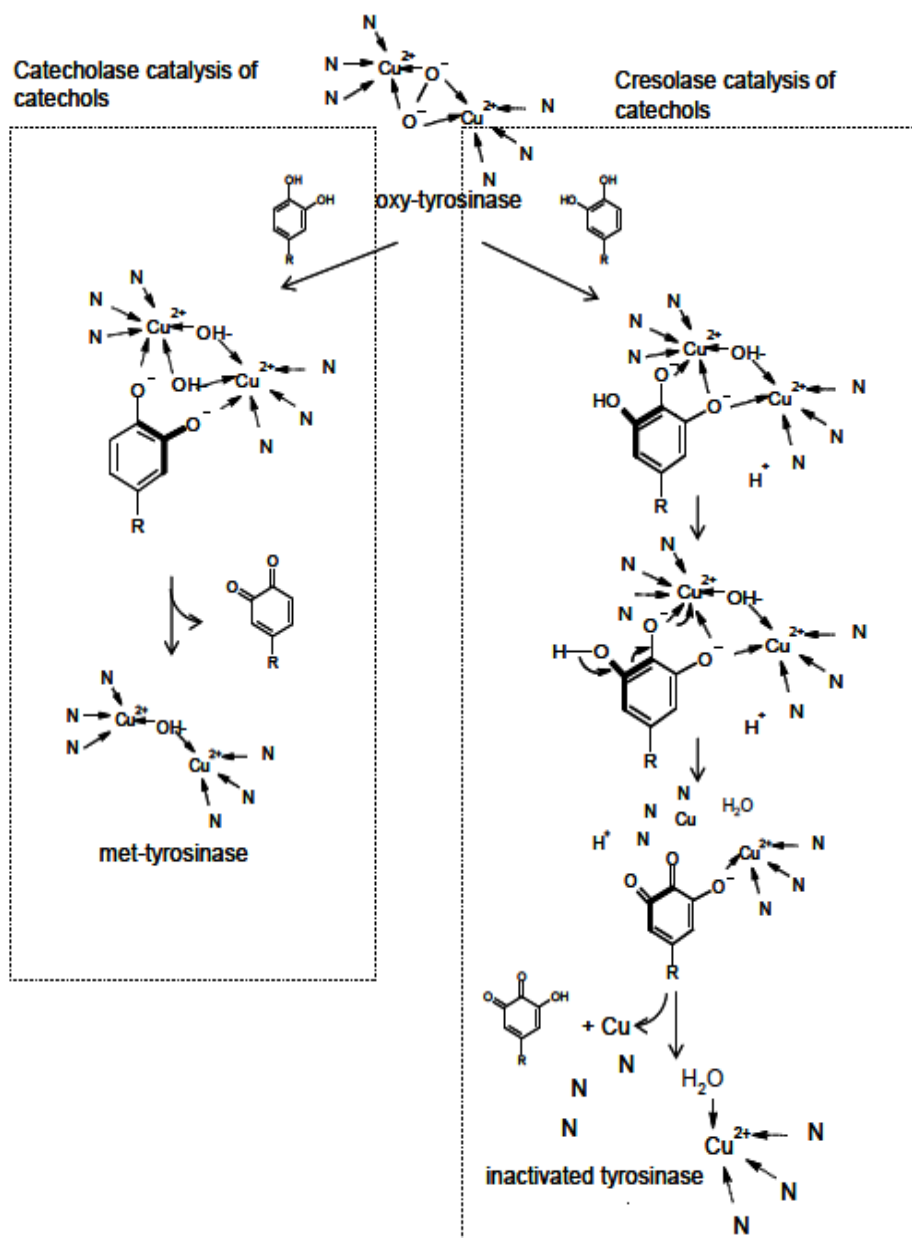


Figura 3.19 – Esquema da inibição suicida da Tirosinase na presença de excesso de substrato difenol.^{75a}

3.3.6 Determinação da concentração de catecol que não provoque inibição na Tirosinase

A inibição inesperada da Tirosinase pelo próprio substrato enzimático difenol, levou a que fosse necessário determinar uma concentração de catecol que não provocasse essa inibição suicida. Fizeram-se vários ensaios de voltametria cíclica, em atmosfera saturada em oxigénio de forma a garantir que Tirosinase estava activa e que a perda de actividade observável apenas resultante da inibição pelo difenol utilizado como substrato. Inicialmente começou com uma concentração de 1 μM de catecol, mas não se observava sinal e por isso aumentou-se a concentração gradualmente. A concentração de catecol mínima para a obtenção de sinal foi 5 μM , contudo continuou-se a aumentar a

concentração de catecol para se obter um sinal mais intenso até uma concentração de 150 μM (Fig.3.20).

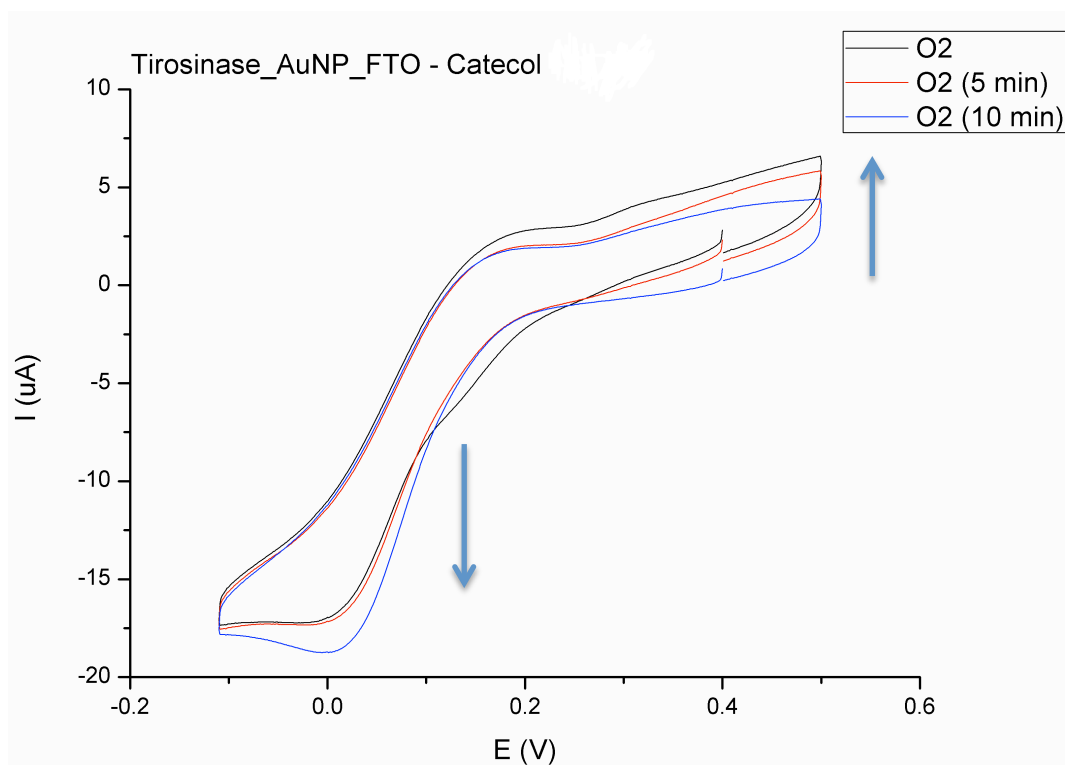


Figura 3.20 - Ensaio de voltametria cíclica com catecol a 150 μM , a uma velocidades de varrimento de 0,1 V/s, no eléctrodo de Tirosinase-AuNP-FTO sem se observar inibição da Tirosinase. Voltamograma preto: Efectuado com a atmosfera saturada em oxigénio; Voltamograma vermelho: Efectuado seguir ao voltamograma preto e permanência do eléctrodo em solução por mais 5 minutos com borbulhamento de oxigénio; Voltamograma azul: Efectuado seguir ao voltamograma vermelho e permanência do eléctrodo em solução por mais 10 minutos com borbulhamento de oxigénio.

Pela análise dos voltamogramas da figura 3.20, observou-se que com o aumento do tempo de permanência do biossensor na solução de 150 μM de catecol, saturada com oxigénio, a corrente catódica aumentava e corrente anódica diminuía. O facto de a corrente catódica ter aumentado e a corrente anódica ter diminuído, com o aumento do tempo de permanência do biossensor na solução do catecol, permitiu concluir que a Tirosinase continuava activa e esta concentração que catecol não a inibe com o tempo.

De forma a determinar a concentração máxima de catecol em que a Tirosinase pode permanecer sem ser inibida, testou-se uma solução de catecol de 200 μM (Fig.3.21).

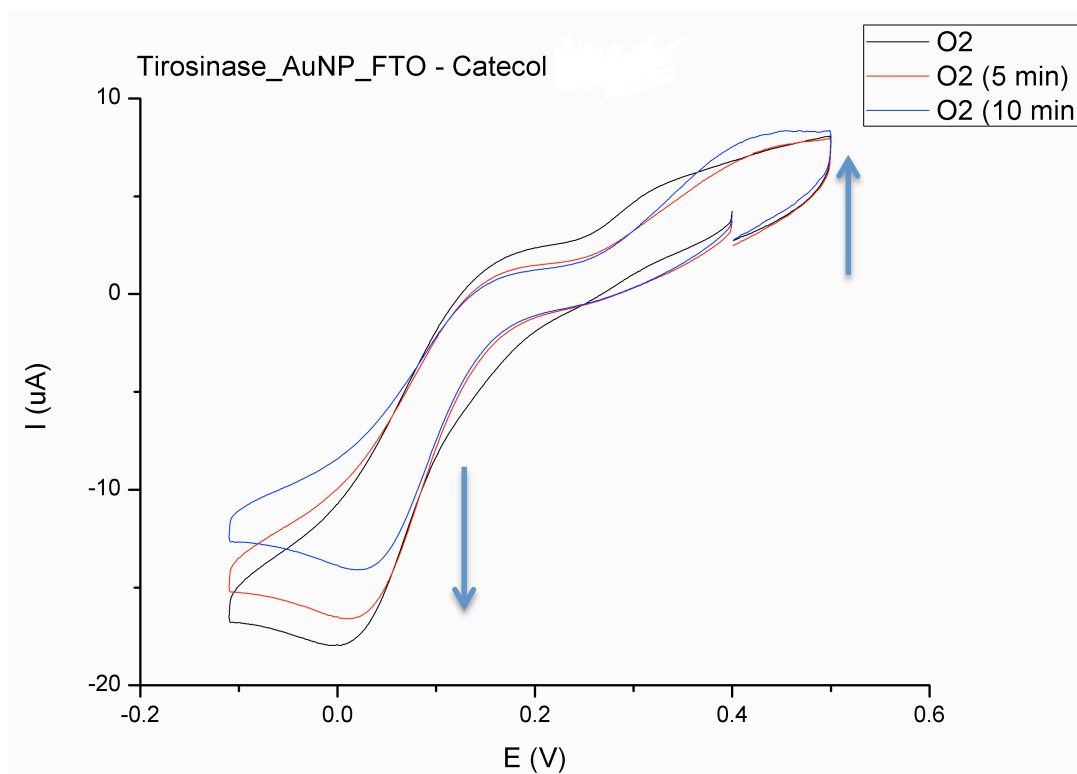


Figura 3.21 - Ensaio de voltametria cíclica com catecol a 200 μM , a uma velocidades de varrimento de 0,1 V/s, no eléctrodo de Tirosinase-AuNP-FTO observar-se inibição clara da Tirosinase. Voltamograma preto: Efectuado com a atmosfera saturada em oxigénio; Voltamograma vermelho: Efectuado seguir ao voltamograma preto e permanência do eléctrodo em solução por mais 5 minutos com borbulhamento de oxigénio; Voltamograma azul: Efectuado seguir ao voltamograma vermelho e permanência do eléctrodo em solução por mais 10 minutos com borbulhamento de oxigénio.

Os voltamogramas da figura 3.21 demonstram que a uma concentração de catecol de 200 μM existia inibição da Tirosinase e que esta ia aumentando ao longo do tempo que o biossensor estava submerso na solução com catecol, o que pôde ser observado pelo decréscimo da corrente do pico catódico e aumento da corrente do pico anódico. O aumento da corrente anódica indicou que o sistema passou a oxidar mais catecol do que oxidara até então, esta diferença devia-se ao catecol que era oxidado pela Tirosinase, e a diminuição da corrente catódica indicou que o sistema passou a reduzir uma concentração de orto-quinona menor e mais semelhante a de catecol oxidado, o que indicou também a inibição da Tirosinase.

Determinou-se assim que a concentração de catecol a ser utilizada em ensaios posteriores de detecção de pesticida seria 150 μM .

3.3.7 Determinação da sensibilidade do biossensor de Tirosinase ao pesticida 2,4-D por ensaios de voltametria cíclica utilizando catecol como substrato

Os ensaios de voltametria cíclica do biossensor de Tirosinase com o pesticida 2,4-D foram efectuados de forma a determinar o limite de detecção (LOD) do biossensor, que pode ser definido como a concentração de analito (C_{LOD}) necessária para dar origem a um sinal (X_{LOD}). O sinal X_{LOD} foi definido em termos do valor médio do sinal do branco (X_B) e do desvio padrão (D_B) do mesmo. O sinal X_{LOD} pode ser calculado através da seguinte formula 3.1:⁷⁸

$$X_{LOD} = X_B + kD_B \quad (3.1)$$

Sendo k um factor escolhido de acordo com o intervalo de confiança desejado. A concentração do analito C_{LOD} pode ser ligada ao sinal obtido correspondente através da fórmula 3.2:⁷⁸

$$C_{LOD} = \frac{(X_L - X_B)}{m} \quad (3.2)$$

Sendo m definido como a sensibilidade analítica expresso como o declive da curva de calibração do analito em estudo, obtida da regressão linear dos pontos experimentais. De forma a facilitar os cálculos, conjugaram-se as fórmulas 3.1 e 3.2, dando origem à fórmula 3.3:⁷⁸

$$C_{LOD} = \frac{(k - D_B)}{m} \quad (3.3)$$

De acordo com diversos autores, k foi definido como sendo igual a 3, uma vez que permitia obter intervalos de confiança de 99,86% para valores de X_B com uma distribuição normal e 89% para valores de X_B que não sigam uma distribuição normal.⁷⁸

Além do limite de detecção, determinou-se ainda a concentração de saturação do biossensor, ou seja, a concentração que origina o sinal máximo do biossensor independentemente de aumentos adicionais da concentração de analito. Por último verificou-se se a concentração aceitável para 2,4-D em água potável estabelecido por lei na União Europeia (0,1 ng/mL,⁶), se encontrava dentro na zona linear de detecção do biossensor.

De forma a observar o comportamento do biossensor na presença do pesticida 2,4-D, realizaram-se ensaios de voltametria cíclica com o biossensor imerso numa solução de catecol a 150 μ M nas quais se aumentou a concentração de pesticida presente em solução, através de adições

sucessivas entre cada ensaio. Desconhecendo à partida a resposta do biossensor, testou-se um aumento da concentração de pesticida no intervalo 0,05 a 1 ng/mL (Fig. 3.22).

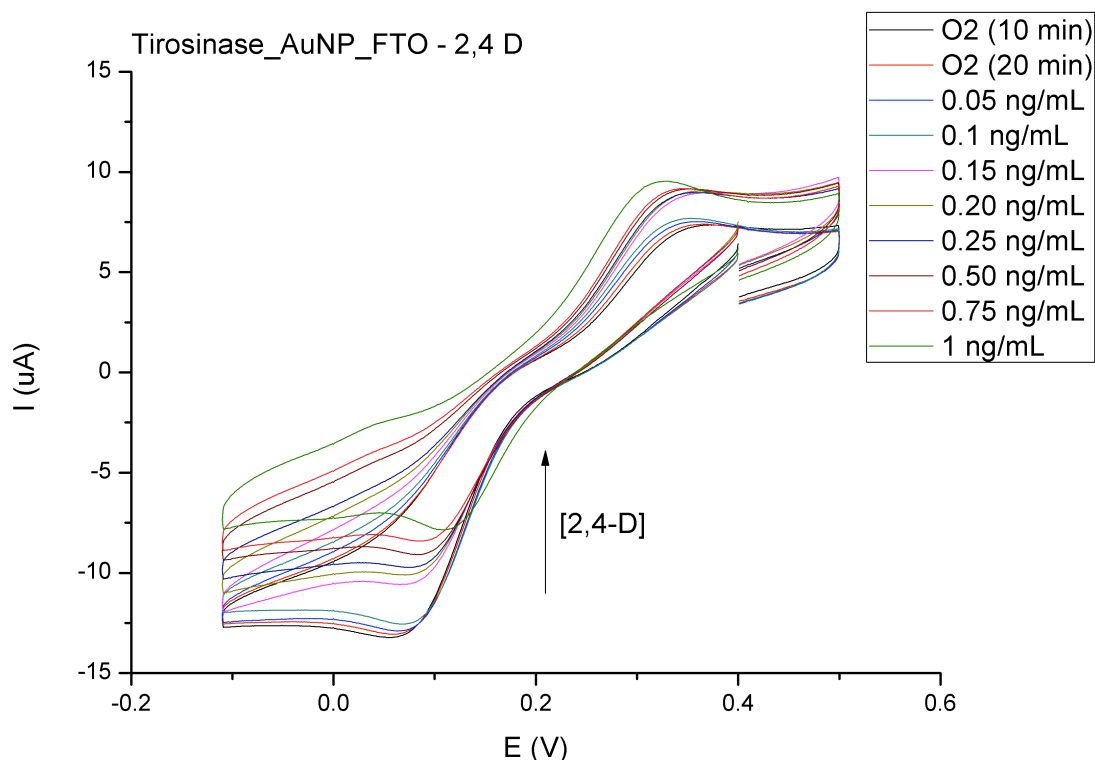


Figura 3.22 – Ensaio de voltametria cíclica utilizando o catecol a 150 μ M como substrato da Tirosinase e aumento da concentração de pesticida 2,4-D antes de cada voltamograma. Velocidade de varrimento = 0,025 V/s. Voltamograma preto: efectuada após a saturação da solução com oxigénio durante 10 minutos; Voltamograma vermelho: efectuada após a saturação da solução com oxigénio durante 20 minutos.

A partir dos resultados obtidos nos primeiros ensaios de voltametria cíclica com adição de pesticida pôde-se afirmar que o biossensor desenvolvido é sensível à presença do pesticida como era esperado, diminuindo a corrente catódica e aumentando a anódica, indicando deste forma a presença inibitória do pesticida. De forma a caracterizar o biossensor determinou-se o LOD e o intervalo de detecção do pesticida 2,4-D pelo biossensor desenvolvido através do rácio I_{pa}/I_{pc} , que é um parâmetro informativo da inibição da enzima. O rácio inferior a 1 indica que existe maior corrente catódica do que corrente anódica no sistema, o que quer dizer que o sistema está a reduzir mais quinonas do que oxidou de compostos fenólicos indicando que o excesso de quinona reduzida foi produzida pela enzima activa. Quando rácio é superior a 1 indica que existe maior corrente anódica do que corrente catódica no sistema, o que quer dizer que o sistema está a reduzir uma quantidade de quinona equivalente à quantidade de compostos fenólicos que oxidou, indicando que não houve produção de quinonas por parte da enzima e que esta está inactiva.^{6, 46b} Fez-se um gráfico das correntes anódica, catódica e do rácio entre as duas em função da concentração de pesticida (Fig. 3.23).

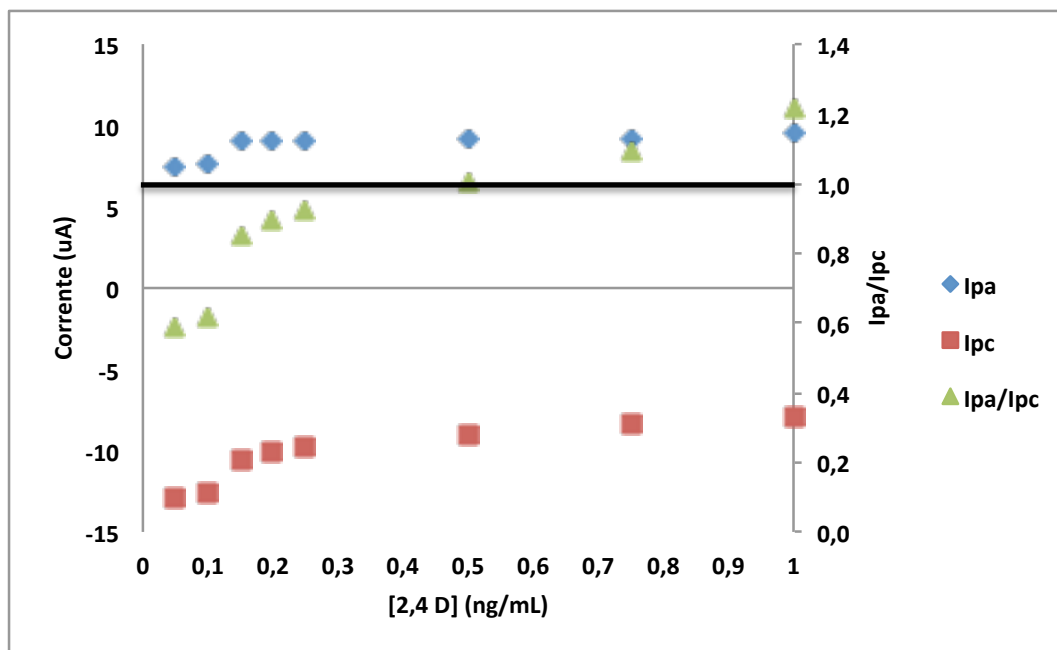


Figura 3.23 – Gráfico das correntes anódica, catódica e o rácio entre ambas em função da concentração do pesticida 2,4-D. Recta preta traçada no gráfico representa o rácio de $I_{pa}/I_{pc} = 1$.

Nos resultados obtidos pelo gráfico da figura 3.23, em especial os resultados do rácio I_{pa}/I_{pc} , concluiu-se que o biossensor apenas pode ser utilizado para efectuar medições no intervalo de concentrações de 2,4-D dos 0,05 ng/mL – 0,5 ng/mL, uma vez que para valores superiores de concentração de pesticida a Tirosinase ficou completamente inibida, pois o rácio I_{pa}/I_{pc} apresentou valores superiores a 1: o traço horizontal a preto na Figura 3.23 representa um valor do rácio $I_{pa}/I_{pc} = 1$. O intervalo de concentrações do pesticida 2,4-D determinado para o biossensor desenvolvido está entre os intervalos já publicados em trabalhos anteriores. Contudo a amplitude de concentrações de pesticida detectadas pelo biossensor é pequena, quando comparada com as amplitudes de ensaios publicados, desta forma estes resultados levaram a que no ensaio posterior fossem utilizadas concentrações de pesticida mais baixas, de forma a aumentar a amplitude de detecção do biossensor.

O LOD foi determinado pelo método anteriormente descrito, utilizando-se os valores de corrente catódica para a construção da curva de calibração do pesticida 2,4-D (os valores de corrente que originaram valores de I_{pa}/I_{pc} não foram utilizados) (Fig. 3.24). O desvio padrão foi calculado através das correntes catódicas dos vários ensaios efectuados sem adição de pesticida, que funcionou como branco, e com o declive obtido pela regressão linear da curva de calibração calculou-se o LOD para este sistema.

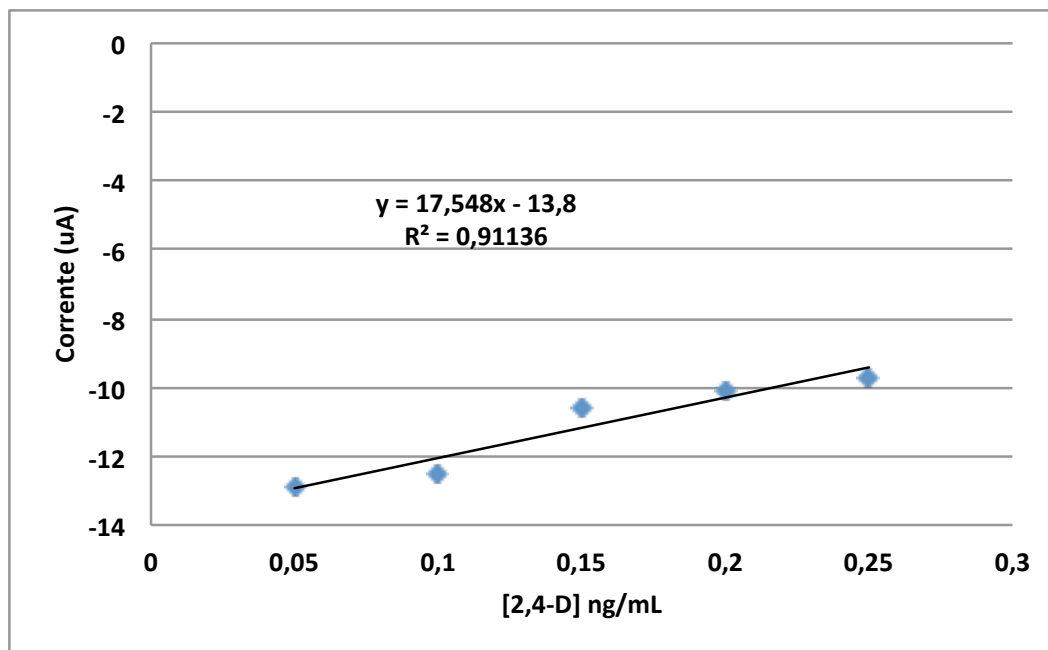


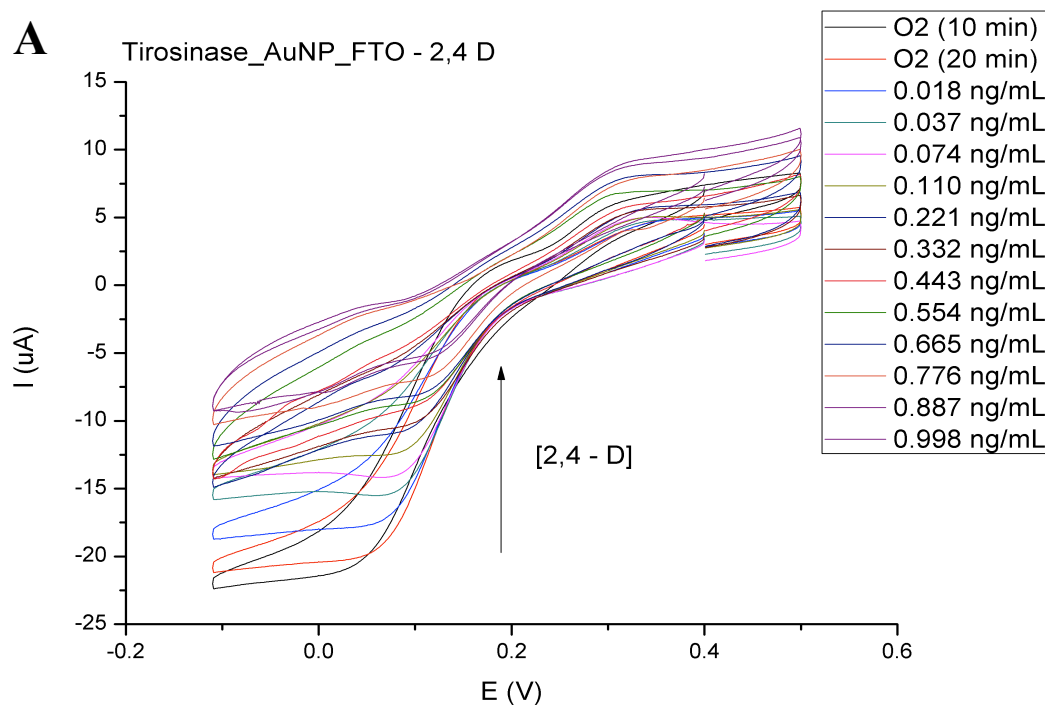
Figura 3.24 – Gráfico da corrente catódica em função da concentração do pesticida 2,4-D.

A média dos valores de corrente catódica, dos ensaios do branco, obtida foi $X_B = -13,165$ com um desvio padrão associado de $D_B = 0,1088$, o $k = 3$ e o declive $m = 17,548$. O LOD para este sistema é igual a:

$$C_{LOD} = \frac{(3 \times 0,1088)}{17,548} = 0,0186 \text{ ng/mL} = 1,86 \times 10^{-5} \mu\text{g/mL}$$

O resultado obtido para o valor de $C_{LOD} = 1,86 \times 10^{-5} \mu\text{g/mL}$ – é um valor bastante aceitável e mais sensível que muito sensores de trabalhos já publicados, como o biossensor desenvolvido por McArdle, *et al.*⁷⁹ que possui um LOD de $1,08 \mu\text{g/mL}$ ou o biossensor desenvolvido por El Kaoutit, *et al.*⁸⁰ com um valor de LOD de $0,1 \mu\text{g/mL}$. Contudo ainda se poderia ter chegado a sensibilidades mais baixas, como o trabalho publicado por Kim, *et al.*^{46b} que desenvolveu um biossensor com um LOD de $0,35 \text{ pg/mL}$ que é bastante mais sensível que o biossensor desenvolvido neste estudo. No entanto, é necessário sublinhar que os valores das publicações anteriormente referidas foram obtidos por ensaios de amperometria e os valores obtidos no presente estudo foram obtidos por voltametria cíclica, o que pode ter levado a discrepâncias dos valores obtidos, uma vez que a utilização da amperometria permite seleccionar o potencial específico para a detecção do composto em estudo, neste caso as quinonas geradas pela oxidação do catecol, o que faz com que o sistema fique maximizado para a detecção deste composto e também reduz a probabilidade de interferências por parte de compostos secundários que possam ser electroactivos. Já a voltametria cíclica a detecção é efectuada num intervalo de potenciais o que possibilita que haja a detecção diversos compostos electroactivos que possam alterar o sinal do composto em estudo e alterando os resultados.

Efectuaram-se novos ensaios de voltametria cíclica com uma gama de concentrações superior à utilizada nos ensaios anteriores, de 0,018 – 21,5 ng/mL, de forma a observar se o biossensor tinha uma maior sensibilidade ao pesticida 2,4-D (Fig.3.25 A) e B)).



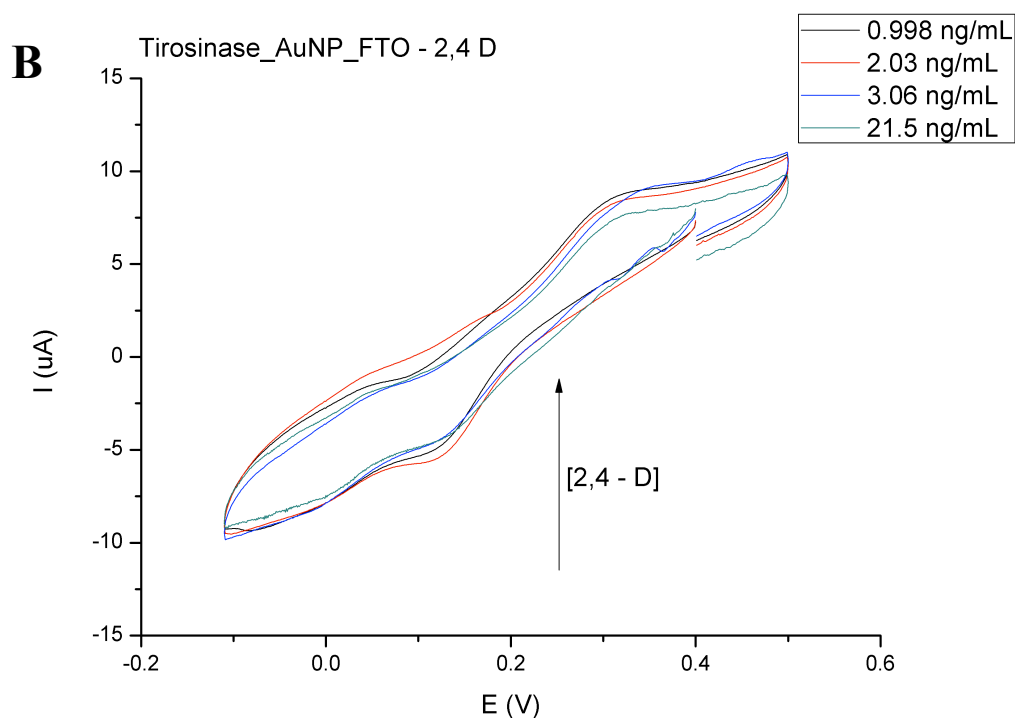


Figura 3.25 - Ensaio de voltametria cíclica utilizando o catecol a 150 μ M como substrato da Tirosinase e aumento da concentração de pesticida 2,4-D antes de cada voltamograma. Velocidade de varrimento = 0,025 V/s. A) – Concentração de 2,4-D: 0,018-0,998 ng/mL; B) – Concentração de 2,4-D: 0,998-21,5 ng/mL.

Através dos resultados obtidos pelos ensaios de voltametria cíclica, representados na figura 3.25, observou-se um perfil de curvas de voltamograma diferente do perfil dos ensaios anteriores o que dificultou a análise dos mesmos, nomeadamente na determinação dos valores de corrente dos picos anódico e catódico. Procedeu-se aos mesmo tratamento de dados que foi efectuado para os ensaios anteriores, calculando-se o LOD e o intervalo de detecção do 2,4-D, de forma a caracterizar o sistema. Traçou-se o gráfico das correntes anódica, catódica e do rácio entre as duas em função da concentração de pesticida (Fig. 3.26).

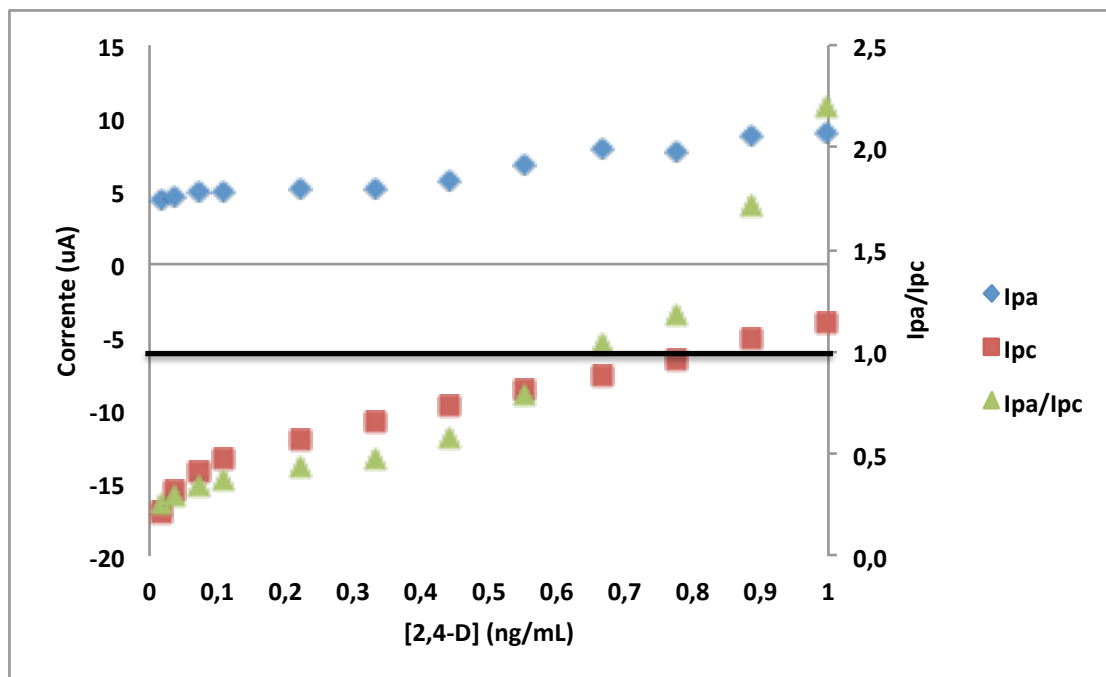


Figura 3.26 – Gráfico das correntes anódica, catódica e o rácio entre ambas em função da concentração do pesticida 2,4-D de 0,018 a 1 ng/mL. Recta preta traçada no gráfico representa o rácio de $I_{pa}/I_{pc} = 1$.

Através da análise dos resultados do rácio I_{pa}/I_{pc} traçados no gráfico da figura 3.26, observou-se que a Tirosinase fica completamente inibida, rácio igual ou superior a 1 (representado pela recta preta traçada no gráfico da figura 3.26), em concentrações de pesticida iguais ou superiores a 0,7 ng/mL, sendo um valor semelhante ao obtido nos resultados do ensaio anterior em que a Tirosinase ficou completamente inibida a uma concentração de 0,5 ng/mL. Foram efectuados ensaios a concentrações superiores aos 0,7 ng/mL, até 1 ng/mL, para se poder garantir que este valor era realmente a concentração máxima de pesticida que o biossensor desenvolvido podia suportar até ficar completamente inibido. Observou-se que o rácio entre a corrente anódica e a catódica (I_{pa}/I_{pc}), para concentrações de pesticida acima dos 0,7 ng/mL, subiu até atingir um valor de 2, o que permitiu reforçar a conclusão de que o biossensor desenvolvido apenas pode ser utilizado na detecção do pesticida 2,4-D até concentrações de 0,5 ng/mL, sendo que após este valor fica completamente inibido por este composto.

Pelos resultados obtidos, nos dois grupos de ensaios efectuados, o biossensor pode ser utilizado para efectuar medições da concentração de pesticida por inibição num intervalo de concentrações dos 0,018 ng/mL até aos 0,7 ng/mL, mas mais uma vez se ressalva que os ensaios foram efectuados por voltametria cíclica e não por amperometria, como já foi descrito em trabalhos anteriores e a voltametria pôde ter trazido mais erro nas determinações efectuadas quando comparada com a amperometria e pôde também ter prejudicado a reproductibilidade dos ensaio, como já foi referido na discussão do ensaio anterior.

No que diz respeito ao LOD deste segundo grupo de ensaios, foi calculado da mesma forma que o LOD do ensaio anterior. O desvio padrão foi calculado através das correntes catódicas dos

vários ensaios efectuados sem adição de pesticida, que funcionou como branco, e com o declive obtido pela regressão linear da curva de calibração do pesticida (Fig. 3.27) calculou-se o LOD para este sistema.

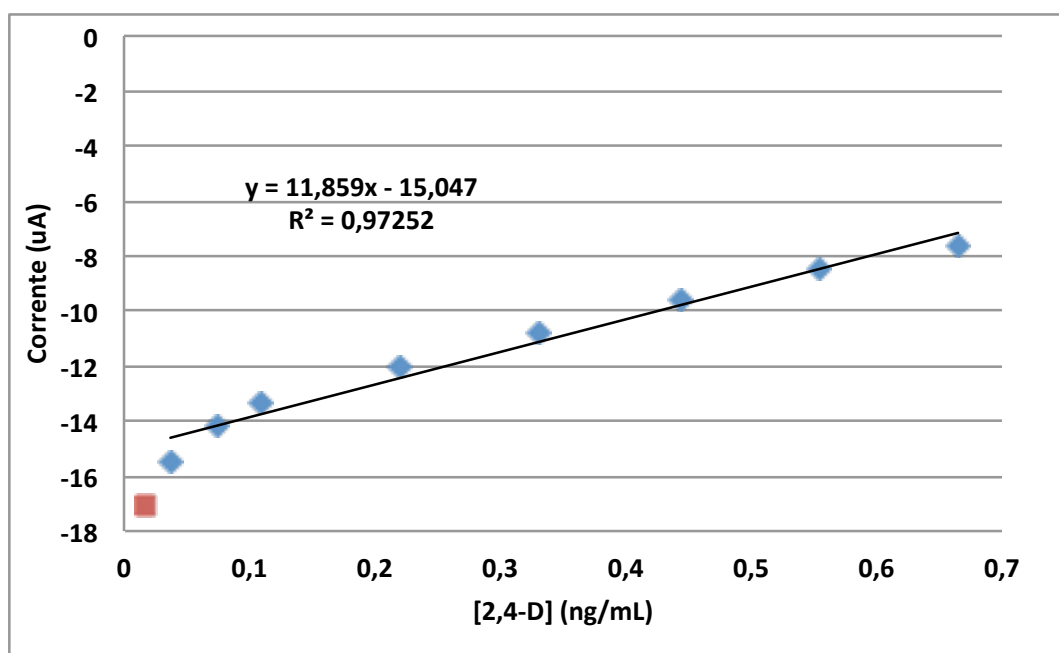


Figura 3.27 – Gráfico da corrente catódica em função da concentração do pesticida 2,4-D. Ponto a vermelho foi excluído de forma a melhorar a qualidade da recta.

A média dos valores de corrente catódica, dos ensaios do branco, obtida foi $X_B = -20,250$ com um desvio padrão associado de $D_B = 0,187$, o $k = 3$ e o declive $m = 11,859$. O LOD para este sistema é igual a:

$$C_{LOD} = \frac{(3 \times 0,187)}{11,793} = 0,0473 \text{ ng/mL} = 4,73 \times 10^{-5} \mu\text{g/mL}$$

O resultado obtido para o valor de $C_{LOD} = 4,73 \times 10^{-5} \mu\text{g/mL}$ – para estes segundo grupo de ensaios é um valor bastante semelhante, da mesma ordem de grandeza, que o valor obtido no primeiro grupo de ensaios – $1,86 \times 10^{-5} \mu\text{g/mL}$ – o que permite afirmar que o biossensor desenvolvido permite obter resultados reprodutíveis e que são coerentes com valores já publicados anteriormente, que foram determinados a partir de ensaios de amperometria o que pode levar a discrepâncias.⁷⁹⁻⁸⁰ Outro resultado positivo foi o facto de o valor de concentração de 2,4-D permitido pela União Europeia – 0,1 ng/mL, estar dentro do intervalo de detecção do biossensor desenvolvido, possibilitando a sua utilização posterior, no mercado de análises clínicas a águas potáveis para a detecção de pesticidas.

3.3.8 Determinação da concentração de pesticida através da percentagem de inibição da enzima

A determinação da concentração de pesticida de uma amostra desconhecida pode ser determinada através da percentagem de inibição observada na enzima do biossensor. Para tal, bastou traçar um gráfico da percentagem de inibição da enzima em função de concentrações de pesticida conhecidas e obter a equação da recta deste gráfico. A equação da recta obtida permite calcular a concentração de pesticidas de amostras desconhecidas com apenas a percentagem de inibição da enzima pelo pesticida presente na amostra (Fig. 3.28).

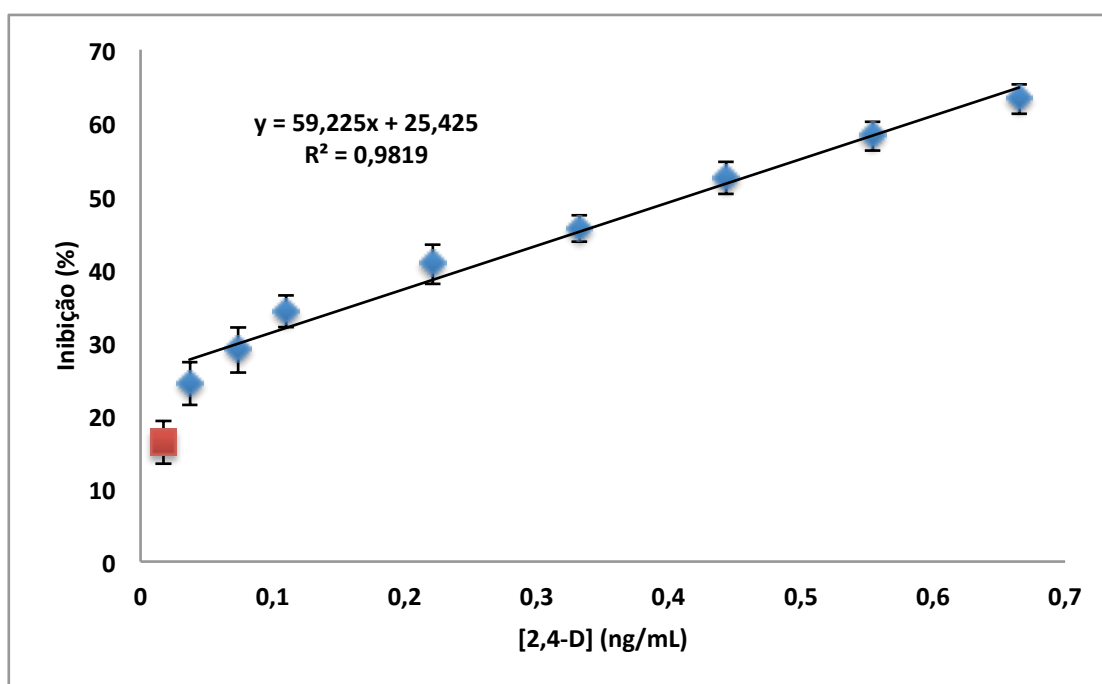


Figura 3.28 – Gráfico da percentagem de inibição da Tirosinase em função da concentração do pesticida 2,4-D. Ponto a vermelho foi excluído de forma a melhorar a qualidade da recta de calibração.

O gráfico da figura 3.28, foi traçado com os valores de concentração de pesticida até 0,7 ng/mL, valor a partir do qual o valor de I_{pa}/I_{pc} é superior a 1. Pela análise do gráfico observou-se que um intervalo razoável para detecção do pesticida, no qual se observou uma inibição gradual do biossensor dos 15 aos 65 %, é entre as concentrações de pesticida dos 0,018 ng/mL até aos 0,7 ng/mL. A partir do gráfico retirou-se uma recta padrão – $y = 64,992x + 22,742$ – que permite calcular a concentração de pesticida 2,4-D em amostra desconhecidas, futuramente testadas.

Capítulo IV: Conclusões

4 Conclusões

Antes de se iniciar o desenvolvimento do biossensor determinaram-se as condições óptimas de pH e força iónica para a execução de todo o futuro trabalho. O valor de pH óptimo a utilizar varia entre o 4 e 8, consoante o ensaio e o revestimento utilizado nas nanopartículas. No que diz respeito à força iónica, esta não pode ser superior a 30 mM de forma a que não ocorra inibição da Tirosinase.

As nanopartículas de ouro, como já foi referido anteriormente nesta dissertação, são sensíveis às mudanças de força iónica em solução. A sensibilidade das nanopartículas à força iónica depende principalmente do seu revestimento. Como foram utilizados três revestimentos diferentes (Citrato, MUA e CALNN) foi necessário verificar a que condições de força iónica as nanopartículas com os três revestimentos deixavam de ser estáveis. As AuNP perderam a sua estabilidade em solução e agregaram a concentrações de NaCl superiores a 30 mM, as AuNP-MUA perderam a sua estabilidade em solução aquando a concentração de NaCl foi superior a 250 mM e as AuNP-CALNN só perderam a sua estabilidade em solução para concentrações de NaCl superiores a 2 M. Dos três tipos de nanopartículas, as AuNP-CALNN são as mais estáveis em solução mesmo em soluções com elevadas forças iónicas.

O pH é outro factor, juntamente com a força iónica, que influencia o comportamento das nanopartículas em solução. Verificou-se a estabilidade das nanopartículas com os três agentes de revestimento com a variação de pH e chegou-se à conclusão que as nanopartículas perdiam a sua estabilidade, assegurada pela carga superficial negativa conferida pela camada do agente de revestimento, quando o valor de pH em solução atingia o valor de pKa do revestimento e este fica com carga neutra levando à agregação das nanopartículas.

A pureza da Tirosinase adquirida foi testada por SDS-PAGE, e a concentração proteica foi determinada pelo método do BCA. Verificou-se pelo método de BCA que a Tirosinase continha diversas impurezas visto que em 1 mg do *stock* de Tirosinase apenas 661 µg correspondiam à proteína sendo os restantes 339 µg impurezas não proteicas. Por SDS-PAGE observaram-se várias bandas no gel, para além das duas bandas características da Tirosinase – a 45 e 14 kDa. Com os resultados obtidos por SDS-PAGE conclui-se as impurezas do *stock* da Tirosinase continham também proteínas. Testou-se ainda se a Tirosinase adquirida estava activa, através de coloração para proteína e para actividade de tirosinase de um gel de electroforese nativo, o resultado foi positivo, uma vez que a banda detectada como sendo proteína (gel corado com Coomassie) foi a mesma banda detectada no gel corado com o produto do metabolismo da Tirosinase, indicando não só que se identificou a Tirosinase no gel, mas como também esta estava activa.

A actividade da Tirosinase livre e em bionanoconjugados foi estudada variando o pH de 4 a 8, de forma a verificar se existia algum bionanoconjugado que trouxesse aumento de actividade da Tirosinase nas diferentes condições. Pelos resultados obtidos, o CALNN foi o único agente de revestimento das nanopartículas, dos utilizados, que promoveu um aumento na actividade da

Tirosinase em bionanoconjugados face à Tirosinase livre, nomeadamente um aumento em 26% a pH 6, 6% a pH 7 e 11% a pH 8. No que diz respeito a pH 4 e 5, a Tirosinase livre apresentou sempre melhores resultados do que a Tirosinase em bionanoconjugados, para os três tipos de revestimento das nanopartículas utilizados.

Desenvolveu-se um biossensor de pesticidas utilizando a Tirosinase ligada por *cross-linking* a um eléctrodo de FTO com nanopartículas de ouro electrodepositadas à sua superfície. O processo de desenvolvimento do biossensor incluiu diversas fases e tiveram de se efectuar diversos testes intermédios de forma a garantir que cada componente adicionado ao eléctrodo de FTO ficava ligado à sua superfície com sucesso.

A electrodeposição do ouro sobre o eléctrodo de FTO foi bem sucedida uma vez que houve um aumento na eficiência do eléctrodo, nos ensaios de voltametria cíclica com ferricianeto de potássio, comprovada pela diminuição da separação dos picos anódico e catódico de 0,152 V para 0,087 V, o potencial formal (E°) passou dos 0,216 V para os 0,225 V (potencial característico do ferricianeto de potássio) no eléctrodo AuNP-FTO e passou a existir uma relação linear entre as correntes anódica e catódica em função da velocidade de varrimento.

O sucesso da ligação da Tirosinase ao eléctrodo MPA-AuNP-FTO foi comprovada, através de ensaios de voltametria cíclica utilizando o ferricianeto de potássio como analito, por uma diminuição da eficiência do eléctrodo. Esta diminuição de eficiência foi caracterizada por um aumento da separação dos picos anódico e catódico de 0,087 V para 0,196 V, o potencial formal (E°) passou dos 0,225 V para os 0,211 V no eléctrodo Tirosinase-AuNP-FTO e deixou de existir uma relação linear entre as correntes anódica e catódica em função da velocidade de varrimento. A perda de eficiência global no eléctrodo comprova a ligação da Tirosinase ao eléctrodo, que sendo um composto orgânico, vai provocar uma diminuição da passagem de corrente entre a solução e o eléctrodo provocando assim a perda de eficiência e reproductibilidade do sistema.

O sucesso da formação de nanopartículas e da ligação da Tirosinase sobre o eléctrodo de FTO foi também comprovado por ensaios de SEM e XPS.

Os resultados do SEM dos três eléctrodos analisados, AuNP-FTP, MPA-AuNP-FTO e Tirosinase-AuNP-FTO, permitiram concluir que a electrodeposição do ouro sobre o eléctrodo de FTO foi um sucesso, formando uma camada de nanopartículas de ouro uniforme por toda a área do eléctrodo e alguns aglomerados de nanopartículas espalhados por todo o eléctrodo. Estes aglomerados de nanopartículas são comuns nos três eléctrodos analisados, levando a concluir que é um acontecimento normal neste tipo de síntese de nanopartículas. Nos eléctrodos MPA-AuNP-FTO e Tirosinase-AuNP-FTO não se observaram alterações à sua superfície, quando comparados com o eléctrodo AuNP-FTO, o que permitiu concluir que a ligação do MPA e mais tarde da Tirosinase não afectou a estrutura de nanopartículas já existente. A quantificação dos elementos, por SEM-EDS, presentes nos eléctrodos apenas detectou estanho, ouro e oxigénio que são os componentes no eléctrodo inicial e das nanopartículas electrodepositadas. Não foram detectados quaisquer elementos

indicativos da ligação do MUA ou da Tirosinase, provavelmente a suas quantidades são muito pequenas e o SEM-EDS não possui sensibilidade suficiente para os detectar.

A análise por XPS dos eléctrodos permitiu detectar ouro, estanho, azoto, enxofre, carbono e cobre. O sucesso da electrodeposição de nanopartículas de ouro foi corroborado pelo XPS devido à detecção de ouro, assim como o sucesso da ligação da Tirosinase ao eléctrodo de FTO devido à detecção de elementos característicos de proteínas como o carbono, o azoto, o enxofre e o cobre. Os resultados de XPS permitiram ainda concluir que a ligação da Tirosinase ao eléctrodo de FTO é específica aos locais do eléctrodo com nanopartículas revestidas por MPA, uma vez que a contribuição do ouro e do enxofre diminui do eléctrodo com Tirosinase ligada quando comparado com o eléctrodo com apenas nanopartículas e MPA. A diminuição da contribuição destes dois elementos indicou que algo, neste caso a Tirosinase, se ligou sobre eles e aumentou a espessura do local, impedido o aparelho de XPS de detectá-los.

O biossensor desenvolvido foi testado, por voltametria cíclica, utilizando como analito o catecol, um substrato da Tirosinase. Os ensaios iniciais com o biossensor permitiram concluir que o catecol em concentrações iguais ou superiores a 200 μM inibia irreversivelmente a Tirosinase, assim todos os ensaios tiveram de ser efectuados com uma concentração de catecol de 150 μM .

Os ensaios de inibição do biossensor desenvolvido foram efectuados com o pesticida 2,4-D através de ensaios de voltametria cíclica. Pelos resultados obtidos determinou-se que o intervalo de concentrações de pesticida detectadas pelo biossensor desenvolvido é dos 0,018 ng/mL – 0,7 ng/mL , com um limite de detecção de $3,29 \times 10^{-5} \pm 1,44 \times 10^{-5}$ $\mu\text{g/mL}$ e com uma concentração de saturação de pesticida que ronda a 1 ng/mL .

Deste modo, conclui-se que o trabalho desenvolvido nesta dissertação consiste, por um lado, numa forma consistente de estudar a utilização de bionanoconjugados para o melhoramento da actividade catalítica de enzimas, em solução, em diversas pré-condições que são requisitos de estudos mais complexos. Por outro lado, o trabalho desenvolvido levou à construção de um biossensor de detecção de pesticidas bem caracterizado em termos estruturais e funcionais. Na caracterização funcional, os estudos finais de inibição com o pesticida 2,4-D e determinação dos parâmetros característicos com o LOD e o intervalo de concentração de pesticida detectável pelo biossensor ficaram um pouco incompletos pois apenas foi possível fazer a determinação destes parâmetros por voltametria cíclica, ficando a faltar a determinação por amperometria que, por falta de equipamento, não foi executada. Este tipo de parâmetros é normalmente calculado a partir dos resultados de amperometria, que são normalmente mais reprodutíveis do que os resultados de voltametria cíclica, como já foi referido anteriormente e comprovado por trabalhos já publicados.^{6, 46b, 79-80} O mesmo se pode afirmar no que diz respeito ao gráfico da percentagem de inibição da Tirosinase em função da concentração de pesticida, que apesar de os resultados serem aceitáveis e algo semelhantes a trabalhos publicados⁶ podem não ser tão reprodutíveis como seriam com resultados obtidos por amperometria. Assim os valores obtidos para estes parâmetros, acima já referidos, não são cem por cento

comparáveis ao valores já publicados, sendo necessário, futuramente, repetir estes ensaios com equipamento apropriado para a execução dos ensaios de amperometria de forma a verificar se os resultados obtidos por voltametria cíclica estão correctos e com os resultados de amperometria determinar novamente a percentagem de inibição da Tirosinase com o aumento da concentração do pesticida 2,4-D, em solução e traçar o gráfico de forma a obter uma recta padrão.

Capítulo V: Bibliografía

5 Bibliografia

1. Mostafa, G. A. E., Electrochemical Biosensors for the Detection of Pesticides. *The Open Electrochemistry Journal* **2010**, 2, 22-42.
2. Guilbault, G. G.; Pravda, M.; Kreuzer, M.; O'Sullivan, C. K., Biosensors - 42 Years and Counting. *Anal Lett* **2004**, 37, 1481-1496.
3. Grieshaber, D.; MacKenzie, R.; Voros, J.; Reimhult, E., Electrochemical biosensors - Sensor principles and architectures. *Sensors-Basel* **2008**, 8 (3), 1400-1458.
4. Chaubey, A.; Malhotra, B. D., Mediated biosensors. *Biosens Bioelectron* **2002**, 17 (6-7), 441-456.
5. Thevenot, D. R.; Toth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S., Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens Bioelectron* **2001**, 16 (1-2), 121-131.
6. Kim, G. Y.; Shim, J.; Kang, M. S.; Moon, S. H., Preparation of a highly sensitive enzyme electrode using gold nanoparticles for measurement of pesticides at the ppt level. *J Environ Monitor* **2008**, 10 (5), 632-637.
7. Liu, T.; Xu, M. R.; Yin, H. S.; Ai, S. Y.; Qu, X. J.; Zong, S. S., A glassy carbon electrode modified with graphene and tyrosinase immobilized on platinum nanoparticles for sensing organophosphorus pesticides. *Microchim Acta* **2011**, 175 (1-2), 129-135.
8. Bakker, E.; Pretsch, E., Potentiometric sensors for trace-level analysis. *Trac-Trend Anal Chem* **2005**, 24 (3), 199-207.
9. Zhang, J. Z.; Luo, A. M.; Liu, P.; Wei, S. P.; Wang, G. M.; Wei, S. Q., Detection of Organophosphorus Pesticides Using Potentiometric Enzymatic Membrane Biosensor Based on Methylcellulose Immobilization. *Anal Sci* **2009**, 25 (4), 511-515.
10. Umino, K.; Habara, M.; Toko, K., Simple Screening Method for Pesticide Residues by Detecting Coexistent Adjuvants Using Potentiometric Measurement. *Sensor Mater* **2012**, 24 (1), 1-11.
11. (a) Patolsky, F.; Zheng, G. F.; Lieber, C. M., Nanowire-based biosensors. *Anal Chem* **2006**, 78 (13), 4260-4269; (b) Stadler, B.; Solak, H. H.; Frerker, S.; Bonroy, K.; Frederix, F.; Voros, J.; Grandin, H. M., Nanopatterning of gold colloids for label-free biosensing. *Nanotechnology* **2007**, 18 (15).
12. Anh, T. M.; Dzyadevych, S. V.; Prieur, N.; Duc, C. N.; Pham, T. D.; Renault, N. J.; Chovelon, J. M., Detection of toxic compounds in real water samples using a conductometric tyrosinase biosensor. *Mat Sci Eng C-Bio S* **2006**, 26 (2-3), 453-456.
13. Agency, U. E. P. What is a pesticide? . <http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm> (accessed June 16).
14. Gilden, R. C.; Huffling, K.; Sattler, B., Pesticides and Health Risks. *Jognn-Journal of Obstetric Gynecologic and Neonatal Nursing* **2010**, 39 (1), 103-110.
15. Lyznicki, J. M.; Kennedy, W. R.; Young, D. C.; Skelton, W. D.; Howe, J. P.; Davis, R. M.; Genel, M.; Karlan, M. S.; Numann, P. J.; Riggs, J. A.; Slanetz, P. J.; Spillman, M. A.; Williams, M.; Allen, J. R.; Rinaldi, R. C., Educational and informational strategies to reduce pesticide risks. *Preventive Medicine* **1997**, 26 (2), 191-200.
16. University, P., *The Benefits of the Pesticides: A Story Worth Telling*. p 29.
17. Helfrich, L., Weigmann, DL, Hipkins, P, and Stinson, ER Pesticides and Aquatic Animals: A Guide to Reducing Impacts on Aquatic Systems. **1996**.
18. Research, C. Market Study: Crop Protection (UC-2805). http://www.ceresana.com/en/market-studies/chemicals/crop-protection/ceresana-research_market-study-crop-protection.html (accessed June 24).
19. Cooper, J.; Dobson, H., The benefits of pesticides to mankind and the environment. *Crop Protection* **2007**, 26 (9), 1337-1348.
20. Kellogg, R. L.; Nehring, R.; Grube, A.; Goss, D. W.; Plotkin, S. Environmental Indicators of Pesticide Leaching and Runoff from Farm Fields. http://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/national/technical/nra/rca/?&cid=nrcs143_014053 (accessed June 1).
21. (a) Damalas, C. A.; Eleftherohorinos, I. G., Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **2011**, 8

- (5), 1402-1419; (b) Service, N. P. Air Quality -- Airborne Synthetic Chemicals. http://www.nps.gov/seki/naturescience/air_synthchem.htm (accessed July 2).
22. REYNOLDS, J. D. INTERNATIONAL PESTICIDE TRADE: IS THERE ANY HOPE FOR THE EFFECTIVE REGULATION OF CONTROLLED SUBSTANCES? <http://www.law.fsu.edu/journals/landuse/Vol131/reynfram.html> (accessed July 2).
23. Johnston, A. E., Soil Organic-Matter, Effects on Soils and Crops. *Soil Use Manage* **1986**, 2 (3), 97-105.
24. Rockets, R. Down On The Farm? Yields, Nutrients And Soil Quality <http://www.scienceagogo.com/news/farming.shtml> (accessed July 2).
25. Program, P. S. E. Ecology and Environmental Considerations, module 6. <http://psep.cce.cornell.edu/tutorials/core-tutorial/module06/index.aspx> (accessed July 2).
26. Agency, U. S. E. P. National Assessment of the Worker Protection Workshop #3. <http://www.epa.gov/oppfead1/safety/newnote/workshop3.htm> (accessed July 2).
27. Ecobichon, D., *Toxic effects of pesticides*. In: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons 5th edition ed.; MacMillan: New York, 1996.
28. Ascherio A; Chen H; Weisskopf MG; O'Reilly E; McCullough ML; Calle EE; Schwarzschild MA; Thun MJ, Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Annals of neurology* **2006**, 60, 197-203.
29. Sanborn, M.; Kerr, K. J.; Sanin, L. H.; Cole, D. C.; Bassil, K. L.; Vakil, C., Non-cancer health effects of pesticides: systematic review and implications for family doctors. *Can Fam Physician* **2007**, 53 (10), 1712-20.
30. Sheiner, E. K.; Sheiner, E.; Hammel, R. D.; Potashnik, G.; Carel, R., Effect of occupational exposures on male fertility: literature review. *Industrial health* **2003**, 41 (2), 55-62.
31. Pimentel, D., ENVIRONMENTAL AND ECONOMIC COSTS OF THE APPLICATION OF PESTICIDES PRIMARILY IN THE UNITED STATES. *Environment, Development and Sustainability* **2005**, 7, 229-252.
32. Industry Task Force II on 2, - D. R. D. Industry Task Force II on 2,4-D Research Data. <http://www.24d.org/default.aspx> (accessed June 19).
33. Troyer, J. R., In the beginning: the multiple discovery of the first hormone herbicides. *Weed Science* **2001**, 49 (2), 290-297.
34. Agency, U. E. P. Pesticides: Analytical Method&Procedures. <http://www.epa.gov/pesticides/methods/index.htm> (accessed July 3).
35. Maylasia, U. S. Reaction Engineering & Adsorption Research Group. <http://chemical.eng.usm.my/bassim/photo-album.htm> (accessed October, 29).
36. Gazit, E., Bionanotechnology vs Nanobiotechnology. In *Plenty Of Room For Biology At The Bottom*, Press, I. C., Ed. 2007.
37. Eustis, S.; El-Sayed, M. A., Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chem Soc Rev* **2006**, 35 (3), 209-217.
38. Roduner, E., Size matters: why nanomaterials are different. *Chem Soc Rev* **2006**, 35 (7), 583-592.
39. Buzea, C.; Pacheco, I. I.; Robbie, K., Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* **2007**, 2 (4), Mr17-Mr71.
40. El-Sayed, M. A., Some interesting properties of metals confined in time and nanometer space of different shapes. *Accounts Chem Res* **2001**, 34 (4), 257-264.
41. Liz-Marzan, L. M., Tailoring surface plasmons through the morphology and assembly of metal nanoparticles. *Langmuir* **2006**, 22 (1), 32-41.
42. Daniel, M. C.; Astruc, D., Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev* **2004**, 104 (1), 293-346.
43. Templeton, A. C.; Pietron, J. J.; Murray, R. W.; Mulvaney, P., Solvent refractive index and core charge influences on the surface plasmon absorbance of alkanethiolate monolayer-protected gold clusters. *J Phys Chem B* **2000**, 104 (3), 564-570.
44. Nassau, K.; McPhail, S.; Biggs, T.; PatankR, H. What causes the colors of metals like gold? <http://www.webexhibits.org/causesofcolor/9.html> (accessed October, 31).

45. Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech, A., Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *J Phys Chem B* **2006**, *110* (32), 15700-15707.
46. (a) Wang, P.; Mai, Z. B.; Dai, Z.; Li, Y. X.; Zou, X. Y., Construction of Au nanoparticles on choline chloride modified glassy carbon electrode for sensitive detection of nitrite. *Biosens Bioelectron* **2009**, *24* (11), 3242-3247; (b) Kim, G. Y.; Shim, J.; Kang, M. S.; Moon, S. H., Optimized coverage of gold nanoparticles at tyrosinase electrode for measurement of a pesticide in various water samples. *J Hazard Mater* **2008**, *156* (1-3), 141-147.
47. Oyama, T.; Okajima, T.; Ohsaka, T., Electrodeposition of gold at glassy carbon electrodes in room-temperature ionic liquids. *J Electrochem Soc* **2007**, *154* (6), D322-D327.
48. Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J., A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discussions of the Faraday Society* **1951**, (11), 55-&.
49. You, C. C.; Verma, A.; Rotello, V. M., Engineering the nanoparticle-biomacromolecule interface. *Soft Matter* **2006**, *2* (3), 190-204.
50. Levy, R., Peptide-capped gold nanoparticles: Towards artificial proteins. *Chembiochem* **2006**, *7* (8), 1141-1145.
51. Ismaya, W. T.; Rozeboom, H. J.; Weijn, A.; Mes, J. J.; Fusetti, F.; Wichers, H. J.; Dijkstra, B. W., Crystal Structure of Agaricus bisporus Mushroom Tyrosinase: Identity of the Tetramer Subunits and Interaction with Tropolone. *Biochemistry-Us* **2011**, *50* (24), 5477-5486.
52. Sanchezferrer, A.; Rodriguezlopez, J. N.; Garcíacanas, F.; Garcíacarmona, F., Tyrosinase - a Comprehensive Review of Its Mechanism. *Bba-Protein Struct M* **1995**, *1247* (1), 1-11.
53. Wichers, H. J.; Recourt, K.; Hendriks, M.; Ebbelaar, C. E. M.; Biancone, G.; Hoeberichts, F. A.; Mooibroek, H.; Soler-Rivas, C., Cloning, expression and characterisation of two tyrosinase cDNAs from Agaricus bisporus. *Appl Microbiol Biot* **2003**, *61* (4), 336-341.
54. Wu, J. J.; Chen, H. B.; Gao, J. Y.; Liu, X. A.; Cheng, W.; Ma, X. J., Cloning, characterization and expression of two new polyphenol oxidase cDNAs from Agaricus bisporus. *Biotechnol Lett* **2010**, *32* (10), 1439-1447.
55. Strothkamp, K. G.; Jolley, R. L.; Mason, H. S., Quaternary Structure of Mushroom Tyrosinase. *Biochem Bioph Res Co* **1976**, *70* (2), 519-524.
56. Wichers, H. J.; Gerritsen, Y. A. M.; Chapelon, C. G. J., Tyrosinase isoforms from the fruitbodies of Agaricus bisporus. *Phytochemistry* **1996**, *43* (2), 333-337.
57. Flurkey, W. H.; Inlow, J. K., Proteolytic processing of polyphenol oxidase from plants and fungi. *J Inorg Biochem* **2008**, *102* (12), 2160-2170.
58. Siegbahn, P. E. M., The catalytic cycle of tyrosinase: peroxide attack on the phenolate ring followed by O-O bond cleavage. *J Biol Inorg Chem* **2003**, *8* (5), 567-576.
59. Gherman, B. F.; Cramer, C. J., Quantum chemical studies of molecules incorporating a Cu₂O₂²⁺ core. *Coord Chem Rev* **2009**, *253* (5-6), 723-753.
60. Kim, G. Y.; Kang, M. S.; Shim, J.; Moon, S. H., Substrate-bound tyrosinase electrode using gold nanoparticles anchored to pyrroloquinoline quinone for a pesticide biosensor. *Sensor Actuat B-Chem* **2008**, *133* (1), 1-4.
61. Ren, J.; Kang, T. F.; Xue, R.; Ge, C. N.; Cheng, S. Y., Biosensor based on a glassy carbon electrode modified with tyrosinase immobilized on multiwalled carbon nanotubes. *Microchim Acta* **2011**, *174* (3-4), 303-309.
62. Hulko, M.; Hospach, I.; Krasteva, N.; Nelles, G., Cytochrome C Biosensor-A Model for Gas Sensing. *Sensors-Basel* **2011**, *11* (6), 5968-5980.
63. Batista, P. D.; Mulato, M., Polycrystalline fluorine-doped tin oxide as sensing thin film in EGFET pH sensor. *J Mater Sci* **2010**, *45* (20), 5478-5481.
64. Luz, J. d. B. C. d. Bionanoconjugados de Citocromo Tri-Hémico em Nanopartículas de Ouro para Biorremediação de Cr(VI). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2011.
65. Purwanto, A.; Widiyandari, H.; Jumari, A., Fabrication of high-performance fluorine doped-tin oxide film using flame-assisted spray deposition. *Thin Solid Films* **2012**, *520* (6), 2092-2095.
66. Moholkar, A. V.; Pawar, S. M.; Rajpure, K. Y.; Bhosale, C. H.; Kim, J. H., Effect of fluorine doping on highly transparent conductive spray deposited nanocrystalline tin oxide thin films. *Appl Surf Sci* **2009**, *255* (23), 9358-9364.

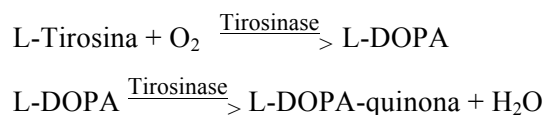
67. Stjerna, B.; Olsson, E.; Granqvist, C. G., Optical and Electrical-Properties of Radio-Frequency Sputtered Tin Oxide-Films Doped with Oxygen Vacancies, F, Sb, or Mo. *J Appl Phys* **1994**, *76* (6), 3797-3817.
68. Park, J. H.; Byun, D. J.; Lee, J. K., Electrical and optical properties of fluorine-doped tin oxide (SnO_x:F) thin films deposited on PET by using ECR-MOCVD. *J Electroceram* **2009**, *23* (2-4), 506-511.
69. Skoog, D. A.; Holler, J. F.; Nieman, T. A., *Principles of Instrumental Analysis*. 6th ed.; 2006.
70. Montana State university, S. E. R. C. Scanning Electron Microscopy (SEM). http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.html (accessed July 15).
71. Walker, C. XPS - X-ray Photoelectron Spectroscopy or ESCA - Electron Spectroscopy for Chemical Analysis. <http://www.uksaf.org/tech/xps.html> (accessed July 15).
72. Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C., Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry* **1985**, *150* (1), 76-85.
73. Sigma-Aldrich, Enzymatic Assay of TYROSINASE (EC 1.14.18.1). Sigma-Aldrich: <http://www.sigmaaldrich.com>, 1994; p 4.
74. Haiss, W.; Thanh, N. T. K.; Aveyard, J.; Fernig, D. G., Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Anal Chem* **2007**, *79* (11), 4215-4221.
75. (a) Chang, T. S., An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *Int J Mol Sci* **2009**, *10* (6), 2440-2475; (b) Yang, Z.; Wu, F., Catalytic Properties of Tyrosinase from Potato and Edible Fungi. *Biotechnology* **2006**, *5* (3), 344-348.
76. Hakkinen, H., The gold-sulfur interface at the nanoscale. *Nature Chemistry* **2012**, *4* (6), 443-455.
77. Nematollahi, D.; Golabi, S. M., Electrochemical study of catechol and 4-methylcatechol in methanol. Application to the electro-organic synthesis of 4,5-dimethoxy- and 4-methoxy-5-methyl-o-benzoquinone. *J Electroanal Chem* **1996**, *405* (1-2), 133-140.
78. Corley, J., Best practices in establishing detection and quantification limits for pesticide residues in foods. 2002; p 18.
79. Mcardle, F. A.; Persaud, K. C., Development of an Enzyme-Based Biosensor for Atrazine Detection. *Analyst* **1993**, *118* (4), 419-423.
80. El Kaoutit, M.; Bouchta, D.; Zejli, H.; Izaoumen, N.; Temsamani, K. R., A simple conducting polymer-based biosensor for the detection of atrazine. *Anal Lett* **2004**, *37* (8), 1671-1681.

Apêndice I

6 Apêndice I

6.1 Protocolo para a determinação da actividade específica da Tirosinase

Princípios



Condições: T = 25 °C; pH = 6,5, A_{280nm}

Reagentes:

- A. Solução tampão fosfato de potássio a 50 mM, pH = 6,5 a 25 °C. Preparar 50 mL da solução em água destilada.
- B. Solução de L-Tirosina a 1mM. Preparar 100 mL da solução em água destilada.
- C. Solução de Tirosinase. Preparar solução contendo entre 500 e 1000 U/mL na solução A, imediatamente antes da utilização.

Procedimento

Prepare o *cocktail* reaccional pipetando com os seguintes reagentes para o recipiente apropriado:

Água deionizada	9 mL
Reagente A	10 mL
Reagente B	10 mL

Misture os componentes e ajuste o pH a 6,5 a 25 °C, utilizando 1 M de NaOH ou 1 M de HCl, caso seja necessário. Imediatamente antes de utilizar, borbulhe a mistura com 99,99% de O₂ puro entre 3 a 5 minutos. Em covettes de quartzo apropriadas adicione:

	Branco	Ensaio
<i>Cocktail</i> reaccional	2,9 mL	2,9 mL

Equilibre a mistura a uma temperatura de 25 °C. Monitorize a A_{280nm} até se tornar constante, utilizando um espectrofotômetro com termóstato. De seguida adicione:

	Branco	Ensaio
Reagente A (Tampão)	0,1 mL	
Reagente C (Solução de Tirosinase)		0,1 mL

Misture de imediato por inversão e registe o aumento da A_{280nm} durante 10 minutos. Obtenha a razão A_{280nm} /minuto utilizando os resultados que representam a taxa máxima de conversão de substrato em produto, para o Branco e para o Ensaio.

Cálculos:

$$\text{Unidades/mL Enzima} = \frac{\left(\frac{\Delta A_{280nm}}{\text{tempo do ensaio}} - \frac{\Delta A_{280nm}}{\text{tempo do branco}} \right) (FD)}{(0,001)(\text{volume de enzima adicionado})}$$

FD = Factor de diluição

0,001 = A mudança que ocorre na A_{280nm} /minuto por unidade de Tirosinase a pH = 6,5 a 25 °C

Definição de Unidade: Uma unidade de Tirosinase causa um aumento de 0,001 na A_{280nm} por minuto a um pH = 6,5 a 25 °C.

Apêndice II

7 Apêndice II

7.1 Ensaios de SEM da superfície dos eléctrodos AuNP-FTO, MPA-AuNP-FTO e Tirosinase-AuNP-FTO

7.1.1 Resultados de SEM da superfície do eléctrodo AuNP-FTO

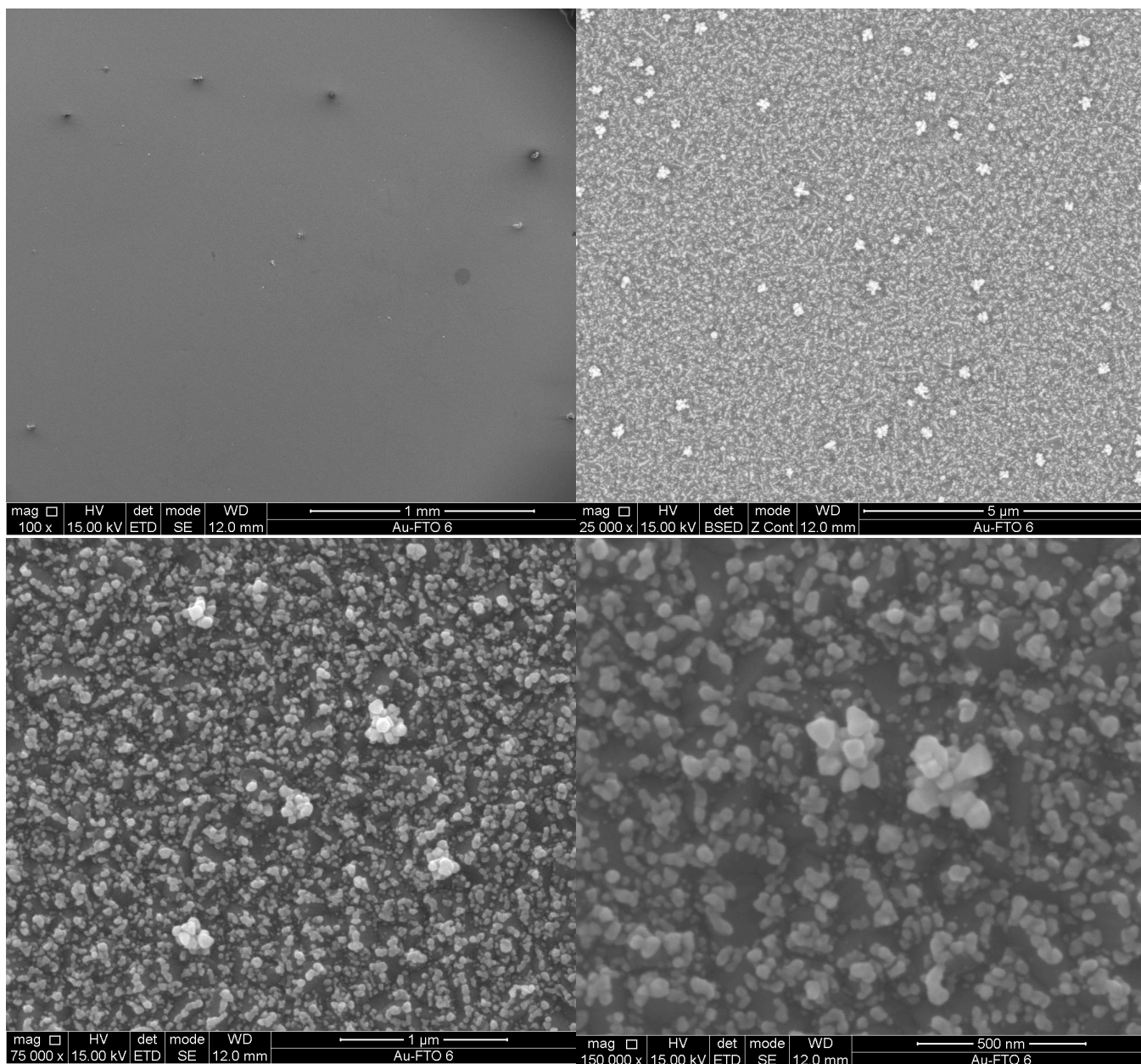


Figura 7.1 – Resultados, obtidos por SEM, da superfície do eléctrodo AuNP-FTO com diferentes ampliações.

7.1.2 Resultados de SEM da superfície do eléctrodo MPA-AuNP-FTO

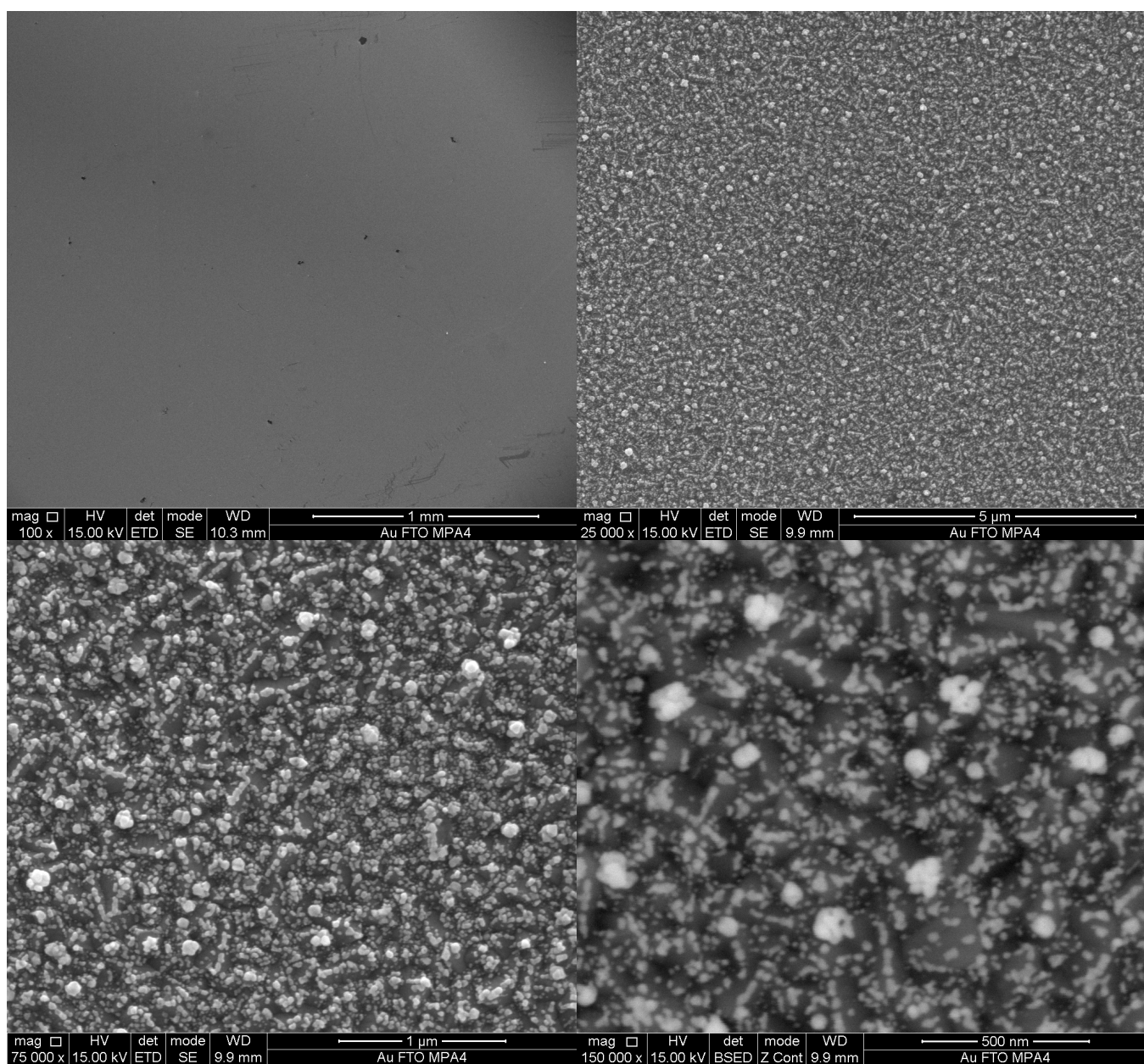


Figura 7.2 – Resultados, obtidos por SEM, da superfície do eléctrodo MPA-AuNP-FTO com diferentes ampliações.

7.1.3 Resultados de SEM da superfície do eléctrodo Tirosinase-AuNP-FTO

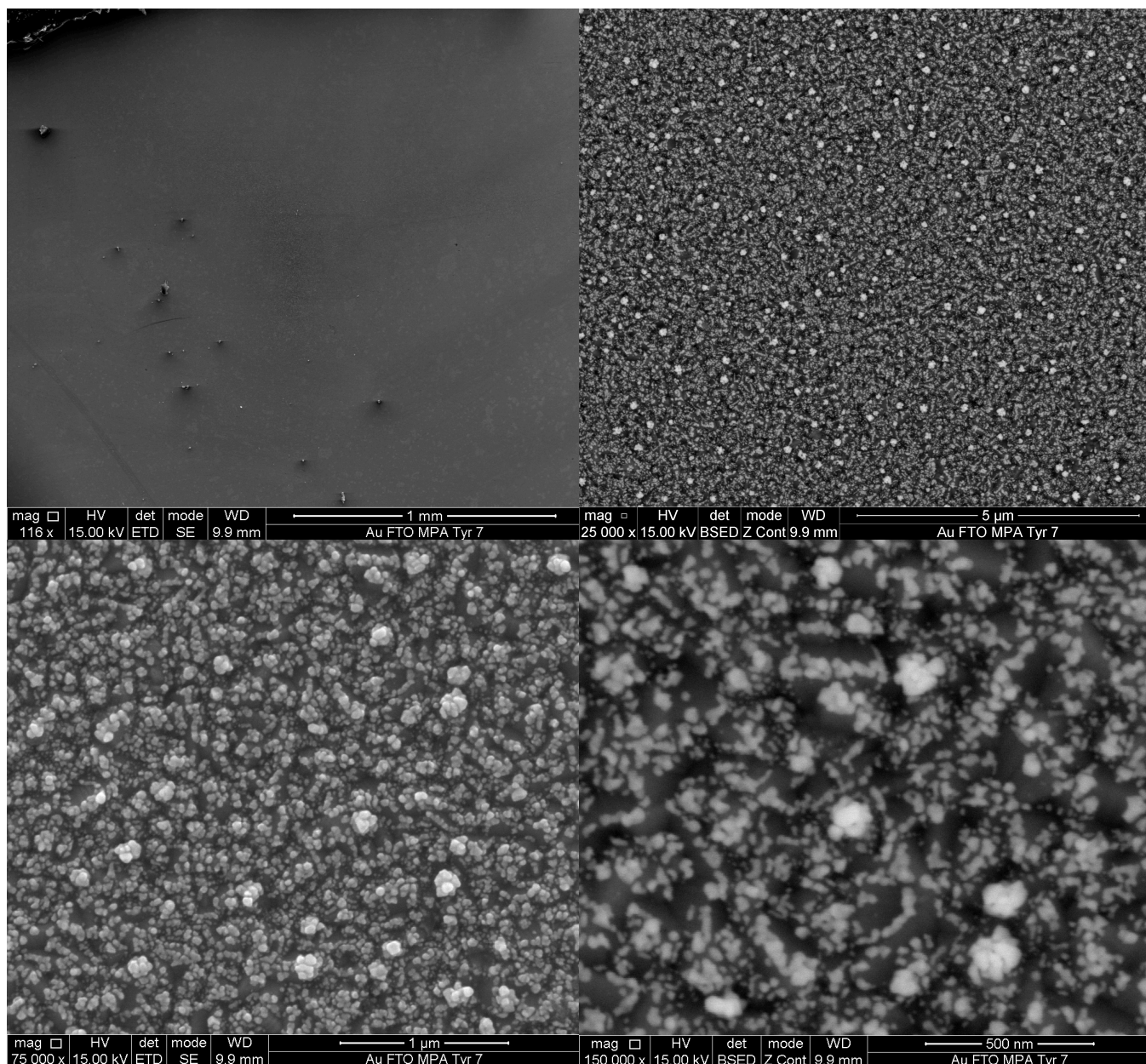
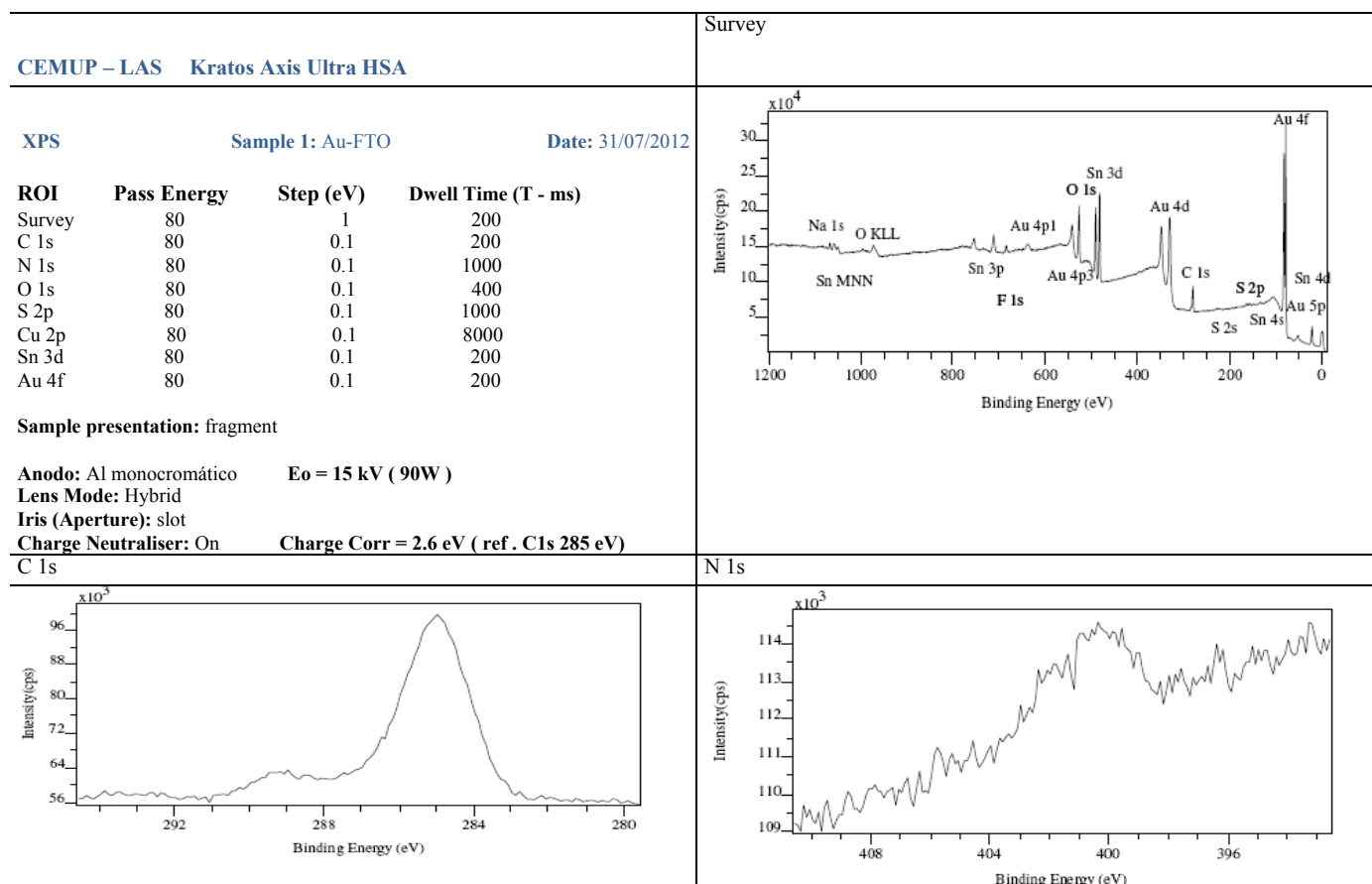


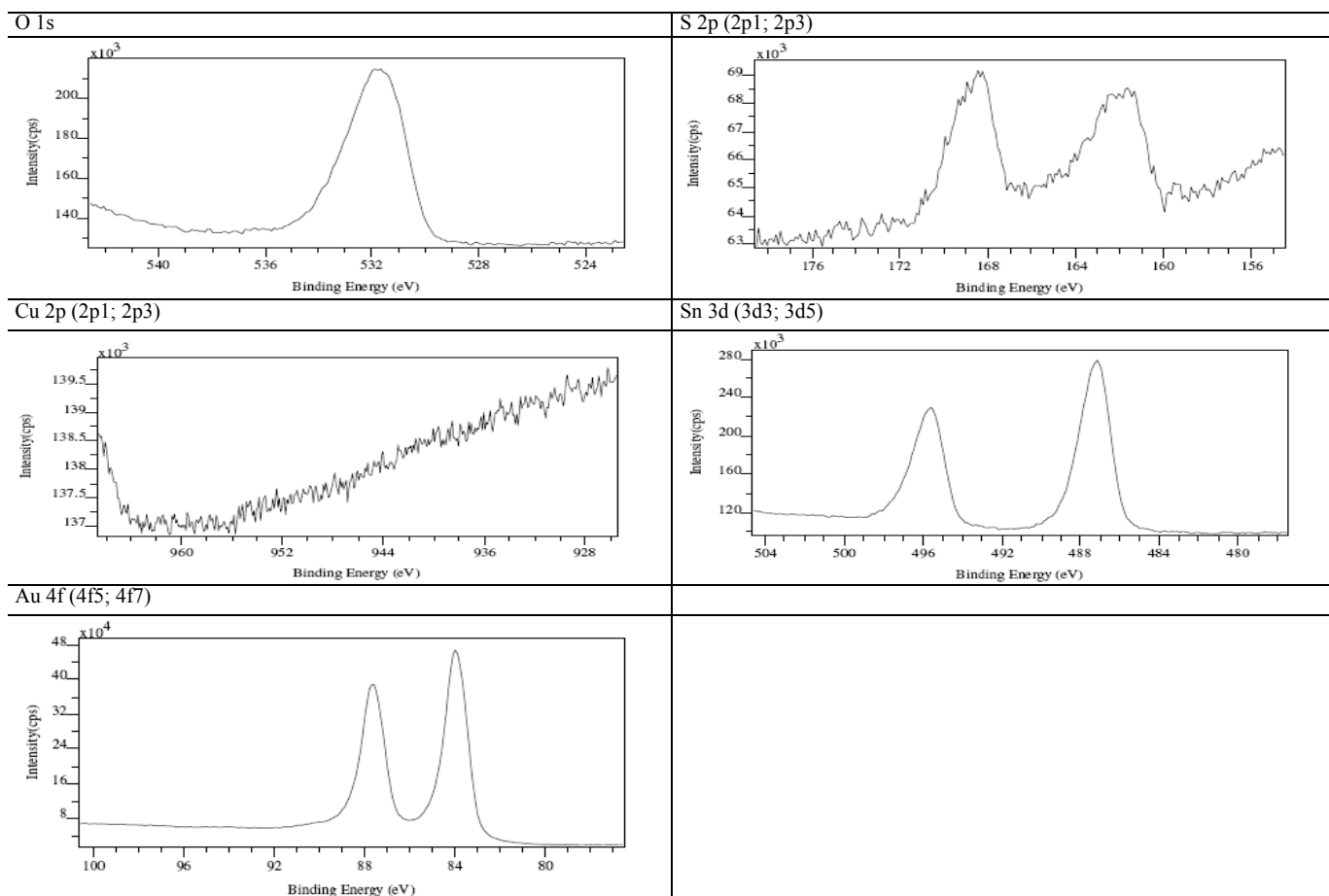
Figura 7.3 – Resultados, obtidos por SEM, da superfície do eléctrodo Tirosinase-AuNP-FTO com diferentes ampliações.

Apêndice III

8 Apêndice III

8.1 Resultados de XPS da superfície do eléctrodo AuNP-FTO





8.2 Resultados de XPS da superfície do eléctrodo Tirosinase-AuNP-FTO

